

Philipps



Universität
Marburg

Import peroxisomaler Matrixproteine über die *Ustilago maydis* Rezeptoren Pex5a, Pex5b und Pex7

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Ast

aus Plauen

Marburg/Lahn, 2017

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden von Dezember 2011 bis August 2016 am Fachbereich Biologie, Abteilung Molekulargenetik der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 16.02.2017.

Gutachter dieser Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bölker
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Christof Taxis

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2017

Teile dieser Arbeit wurden und werden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Freitag, J., Ast, J., Bölker, M. Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature*. 2012 May 23; 485(7399):522-5.

Ast, J., Freitag, J., Martorana, D., Bölker, M. Peroxisomal import receptors in a basidiomycetes fungus. (in Vorbereitung)

Ast, J.*, Martorana, D.*, Renicke, C., Linne, U., Taxis, C., Sandrock, B., Freitag, J., Bölker, M. The sequence of peroxisomal targeting signals contribute to the generation of peroxisome subpopulations. (in Vorbereitung)

* zu gleichen Teilen beigetragen

Für die Wissenschaft

Zusammenfassung

Peroxisomen sind von einer einfachen Membran umschlossene Organellen, die in den meisten eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind essentiell für den Abbau von Fettsäuren und entgiften das dabei entstehende Wasserstoffperoxid. Peroxisomen und ihr enzymatischer Inhalt passen sich an die Umgebungsbedingungen und den Lebenszyklus an. Dabei können sich diese Organellen sogar so weit spezialisieren, dass sie neue Funktionen übernehmen. Trotz ihrer Diversität ist das Importsystem, mit dem lösliche Proteine aus dem Zytosol in die Peroxisomen transportiert werden, hoch konserviert.

Peroxisomale Matrixproteine werden im Zytosol translatiert und im gefalteten Zustand von einem löslichen Rezeptor in die Peroxisomen importiert. Die Erkennung erfolgt dabei über peroxisomale Targeting-Signale (PTS). Diese Signale befinden sich entweder nahe des N-terminalen Endes (PTS2) oder am C-terminalen Ende (PTS1) des Proteins und werden von dem PTS2-Rezeptor Pex7 oder dem PTS1-Rezeptor Pex5 gebunden. Im Folgenden wird das geladene Matrixprotein, das Cargo, zur peroxisomalen Membran gebracht und in die Matrix transloziert. Abschließend werden die Rezeptoren recycelt und stehen für eine neue Importrunde zur Verfügung.

Der phytopathogene Basidiomycet *Ustilago maydis* weist zwei Pex5 und ein Pex7 auf. Der Phänotyp einer *pex5b*-Deletionsmutante ist prominenter als der einer *pex5a*-Deletion. Beide Mutanten zeigen eine reduzierte Filamentbildung, verminderte Virulenz und ein eingeschränktes Wachstum auf Fettsäuren.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Pex5a als auch Pex5b essentiell für die Verstoffwechselung von Fettsäuren sind, während der PTS2-Rezeptor unter diesen Bedingungen nicht benötigt wird. In einer bioinformatischen Analyse konnten PTS2-Proteine identifiziert werden, wobei von vielen keine Funktion bekannt ist und einige zusätzliche Zielsteuerungssignale aufweisen. Der überwiegende Teil der peroxisomalen Matrixenzyme erreicht dieses Organell über die PTS1-Rezeptoren.

Bei Lokalisationsuntersuchungen von PTS1-Proteinen fiel auf, dass diese immer im Zytosol verbleiben, wenn *pex5b* deletiert war. Auf einige traf das auch nach Deletion von *pex5a* zu, obwohl diese Proteine in Wildtyp-Zellen peroxisomale Lokalisierung zeigten. Folglich werden für den Import mancher PTS1-Proteine sowohl Pex5a als auch Pex5b benötigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Pex5a nur in Anwesenheit von Pex5b den Importzyklus durchlaufen kann und dass diese Abhängigkeit über die N-terminale Domäne (NTD) von Pex5b vermittelt wird. Die NTD von Pex5b enthält auch die Pex7-bindende Domäne und ist für den Pex7-vermittelten PTS2-Import essentiell.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Cargo-Pex5-Interaktion nicht ausschließlich über die PTS1-Bindetasche von Pex5 vermittelt wird und so zusätzlich zwischen Cargos diskriminiert werden könnte. Da *pex5a* und *pex5b* außerdem während des Lebenszyklus von *U. maydis* differentiell exprimiert werden, legt dies nahe, dass Pex5a und Pex5b als Regulatoren des peroxisomalen Proteoms fungieren. Dabei könnten sie das enzymatische Repertoire der Peroxisomen an den durch die Umgebungsbedingungen bestimmten Bedarf anpassen.

Abstract

Peroxisomes are organelles surrounded by a single membrane and are near-ubiquitous to eukaryotic cells. These organelles are essential for degradation of fatty acids and detoxify the in this process produced hydrogen peroxide. Peroxisomes can adapt their enzymatic content to the environment and the life cycle. Specialised peroxisomes can adopt very specific functions and are only found in a few cell types or organisms. Despite their diversity, peroxisomes share the same import system to transport proteins from the cytosol into the peroxisomal matrix.

Peroxisomal proteins are translated in the cytosol and are imported as fully folded and co-factor bound proteins and even as oligomers. The vast majority of peroxisomal proteins contain a short conserved C-terminal targeting signal (PTS1). These proteins are imported by a conserved cytosolic receptor protein, Pex5. Only a few peroxisomal proteins carry an N-terminal targeting signal (PTS2), which is recognized by the receptor protein Pex7. After transferring the matrix protein across the peroxisomal membrane, the import receptors are recycled for further rounds of import.

The plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* encodes two Pex5 receptors (Pex5a, Pex5b) and one Pex7 receptor. Deletion of *pex5a* abolished growth on oleic acid but has nearly no effect on pathogenic development. In contrast, Pex5b was found to be important not only for growth on fatty acids, but also for filament formation and virulence.

While both Pex5a and Pex5b are essential for growth on oleic acid the PTS2 receptor is not required under these conditions. Many PTS2 proteins found in a bioinformatic analysis are of unknown function and some of them harbour additional targeting signals, leading to the conclusion that most matrix proteins are imported by the PTS1 receptors, especially during growth on oleic acid.

Deletion of *pex5b* disrupted the peroxisomal targeting of all PTS1 proteins. Despite their co-localisation with a peroxisomal marker protein in wild type cells, a few were found to additionally reside in the cytosol after deletion of *pex5a*. Thus, the peroxisomal targeting of some PTS1 proteins depends on Pex5a as well as Pex5b. In this work it could be shown, that for import functions Pex7 depends on the presence of Pex5b. As a conclusion, Pex5b serves as co-receptor for both Pex5a and Pex7.

Pex5a and Pex5b do not only interact with their cargos by binding of the PTS1. It is feasible that additional interactions may serve to discriminate between different cargos. Additionally, transcription of *pex5a* and *pex5b* is differentially regulated during the life cycle of *U. maydis* suggesting modulation of the peroxisomal proteome in adaption to the environment.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Peroxisomen: Funktion und Biogenese	1
1.2 Import peroxisomaler Matrixproteine	3
1.2.1 PTS1-Import	4
1.2.2 PTS2-Import	6
1.2.3 PTS-unabhängiger Import	9
1.3 β -Oxidation von Fettsäuren in <i>U. maydis</i>	10
1.4 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus	11
1.5 Fragestellung	13
2 Ergebnisse	14
2.1 In <i>U. maydis</i> ist Pex5b am Pex7-abhängigen Import von PTS2-Proteine beteiligt	14
2.1.1 Die Deletion von <i>pex7</i> verhindert den peroxisomalen Import von PTS2-Proteinen	14
2.1.2 Pex5b fungiert als Co-Rezeptor im PTS2-Import	15
2.1.3 Nur ein geringer Anteil der peroxisomalen Matrixproteine weist ein PTS2 auf	16
2.2 Peroxisomale Importrezeptoren in <i>U. maydis</i> weisen konservierte Aminosäuren, Motive und Domänen auf	16
2.2.1 Aufbau des Importrezeptors Pex7	16
2.2.2 Aufbau der Importrezeptoren Pex5a und Pex5b	17
2.3 Für das Wachstum auf Ölsäure ist der Import peroxisomaler Matrixproteine essentiell	19
2.3.1 Für das Wachstum auf Ölsäure ist nicht der PTS2- jedoch der PTS1-Proteinimport essentiell	19
2.3.2 Pex5a und Pex5b sind nicht austauschbar während des Wachstums auf Ölsäurehaltigem Agar	21
2.4 Die Funktion von Pex5a als PTS1-Rezeptor ist abhängig von Pex5b	23
2.4.1 Das peroxisomale Targeting der meisten PTS1-Proteine ist unbeeinflusst von einer <i>pex5a</i> -Deletion	23
2.4.2 Pex5a ist nur in Anwesenheit der N-terminalen Domäne von Pex5b funktionell	24
2.5 Sowohl Pex5a als auch Pex5b sind in der Bäckerhefe funktionell	26
2.6 Pex5a und Pex5b weisen unterschiedliche Cargospezifitäten auf	28
2.6.1 Einige PTS1-Proteine werden vorwiegend oder ausschließlich von Pex5a erkannt	28
2.6.2 Generierung chimärer Pex5-Proteine	31
2.6.3 Pex5a-spezifische PTS1-Proteine werden von der TPR-Domäne dieses Rezeptors erkannt	32
2.6.4 Konservierte Aminosäuren innerhalb der TPR-Domänen von Pex5-Proteinen sind auch in <i>U. maydis</i> vorhanden	32

2.6.5	Einige Enzyme der β -Oxidation werden bevorzugt von Pex5a erkannt	34
2.6.6	Um01966, Um10665 und Um11001 werden mit veränderten PTS1 unabhängig von Pex5a ins Peroxisom importiert	37
2.6.7	Nicht allein die TPR-Domäne von Pex5a ist verantwortlich für die Bindung der Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001	40
2.7	Sowohl Pex5a als auch Pex5b werden für das Wachstum auf Fettsäuren benötigt	43
3	Diskussion	45
3.1	Der PTS2-Importweg in <i>U. maydis</i> ist funktionell	45
3.1.1	<i>UmPex7</i> weist die über Reichsgrenzen hinaus konservierte Struktur auf	45
3.1.2	Besitzt <i>UmPex7</i> ein Motiv zum Docking an die peroxisomale Membran?	45
3.1.3	Nur wenige Proteine sind exklusive Targets von Pex7	47
3.1.4	Für die Verstoffwechselung von Ölsäure ist der PTS2-Importweg nicht essentiell	49
3.2	Pex5b ist der zentrale Rezeptor im Import peroxisomaler Matrixproteine	50
3.2.1	Pex5b fungiert als PTS2-Co-Rezeptor	50
3.2.2	Pex5a und Pex5b sind PTS1-Rezeptoren, aber Pex5a hängt funktionell von Pex5b ab	50
3.3	Die PTS1-Importrezeptoren erkennen teilweise unterschiedliche Cargos	54
3.3.1	Das peroxisomale Targeting einiger PTS1-Proteine hängt von der TPR-Domäne von Pex5a ab	55
3.3.2	Auch die NTD von Pex5a ist an der Bindung einiger Cargos beteiligt	56
3.3.3	Die TPR-Domänen von <i>U. maydis</i> Pex5a und Pex5b und von <i>S. cerevisiae</i> Pex5p unterscheiden sich nicht in konservierten Aminosäuren	58
3.4	<i>U. maydis</i> PTS1-Rezeptoren und ihre Rolle in der peroxisomalen β -Oxidation	60
3.5	Pex5a und Pex5b als Regulatoren des peroxisomalen Proteoms	63
3.6	Verwandtschaftsbeziehungen zu Pex5-Proteinen anderer Organismen	66
4	Anhang	68
5	Material und Methoden	80
5.1	Allgemeine Materialien und Bezugsquellen	80
5.1.1	Chemikalien	80
5.1.2	Puffer und Lösungen	80
5.1.3	Kits	80
5.1.4	Enzyme	80
5.1.5	Antikörper	80
5.1.6	Weitere Materialien	81
5.2	Molekularbiologische Methoden	81
5.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	81

5.2.2	Isolation genomischer DNA aus den Pilzen <i>S. cerevisiae</i> und <i>U. maydis</i>	82
5.2.3	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	82
5.2.4	Dephosphorylierung von DNA	82
5.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	83
5.2.6	Annealing einzelsträngiger DNA-Stücke	84
5.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	84
5.2.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	84
5.2.9	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	84
5.2.10	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	85
5.2.11	Sequenzierung von DNA	85
5.2.12	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)	85
5.2.13	Herstellung von radioaktiv markierten Sonden	86
5.3	Kultivierung von Mikroorganismen	86
5.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	86
5.3.2	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	87
5.3.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	88
5.3.4	Bestimmung der optischen Dichte von Kulturen	89
5.4	Mikrobiologische und genetische Methoden	89
5.4.1	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	89
5.4.2	Protoplastierung von <i>U. maydis</i> -Zellen und Transformation	90
5.4.3	Integration von Vektoren in den genomischen <i>sdh2</i> -Lokus	91
5.4.4	(Teil-)Deletion oder teilweiser Austausch von Genfragmenten in <i>U. maydis</i>	91
5.4.5	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	92
5.5	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	92
5.5.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	92
5.5.2	<i>Ustilago maydis</i> -Stämme	92
5.5.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	106
5.5.4	Plasmide und Oligonukleotide	106
5.6	Mikroskopie	116
5.7	Biochemische Methoden	116
5.7.1	Isolierung denaturierter Proteine aus <i>U. maydis</i>	116
5.7.2	Protein-Elektrophorese	116
5.7.3	Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)	117
5.8	Bioinformatik	118

Abbildungsverzeichnis

1	Import von PTS1-Proteinen aus dem Zytosol in die Peroxisomen	4
2	Struktur der TPR-Domäne von Pex5 von <i>Homo sapiens</i> mit gebundenem PTS1.	5
3	Die klassische Tertiärstruktur einer WD40-Domäne.	7
4	Struktur der PTS2-Domäne von 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase im Komplex mit Pex7p und Pex21p von <i>S. cerevisiae</i> .	8
5	Der peroxisomale Import von PTS2-Proteinen hängt von Pex7 ab.	14
6	Peroxisomale Lokalisierung von PTS2-GFP hängt von Pex5b ab.	15
7	Struktur von Pex7 in <i>U. maydis</i> .	17
8	Struktur von Pex5a und Pex5b von <i>U. maydis</i> .	18
9	Funktionelle Peroxisomen sind essentiell für das Wachstum auf Ölsäure-haltigem Agar.	20
10	Intrazelluläre Lokalisierung vom peroxisomalen Marker mCherry-SKL in Deletionsmutanten verschiedener Peroxine.	21
11	<i>pex5a</i> und <i>pex5b</i> können einander nicht komplementieren.	22
12	HA-getaggte Varianten von Pex5 komplementieren den Deletionsphänotyp.	25
13	Pex5a kann in Anwesenheit der NTD von Pex5b mCherry-SKL importieren.	25
14	Pex5a und Pex5b von <i>U. maydis</i> sind funktionelle PTS1-Rezeptoren in <i>S. cerevisiae</i> .	26
15	Einige Proteine lokalisieren peroxisomal in Abhängigkeit von Pex5a und Pex5b.	28
16	Einige Proteine lokalisieren peroxisomal in Abhängigkeit von Pex5a und Pex5b.	29
17	Shy1 lokalisiert nicht im Peroxisom.	30
18	Nur eins von vier PTS1-Proteinen, deren peroxisomales Targeting in <i>U. maydis</i> sowohl von Pex5a als auch von Pex5b abhängt, lokalisiert auch peroxisomal in <i>S. cerevisiae</i> .	30
19	Generierung der Pex5-Chimären an den Pex5-Loki.	31
20	Die Proteine GFP-PTS1 _{Gapdh2Pb} und GFP-PTS1 _{Shy1} werden vorwiegend von Pex5a erkannt.	33
21	Der Großteil der am Fettsäureabbau beteiligten Enzyme besitzt ein PTS1 (nächste Seite).	34
22	Das peroxisomale Targeting von Um01966, Um10665 und Um11001 nimmt ab, wenn <i>pex5a</i> deletiert ist.	36
23	Durch Optimierung des PTS1 können die Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001 effektiv von Pex5b erkannt werden.	38
24	Ein optimiertes PTS1 einzelner, Pex5a-spezifischer β -Oxidationsenzyme verbessert nicht das Wachstum der $\Delta pex5a$ -Zellen unter Fettsäurebedingungen.	39

25	Effizientes peroxisomales Targeting von Um01966, Um10665 und Um11001	
	hängt nicht allein von der TPR-Domäne von Pex5a ab (nächste Seite).	40
26	Um01966 lokalisiert auch ohne funktionelles PTS1 peroxisomal.	42
27	Wachstumsphänotyp verschiedener Pex5-Mutanten und -Chimären.	44
28	In <i>S. cerevisiae</i> ist das Motiv YSPFF in Pex7p teilweise zugänglich.	46
29	Import peroxisomaler Matrixproteine in <i>U. maydis</i>	54
30	Phylogenetischer Baum: Pex5-Proteine verschiedener Organismen.	67
31	WD-40 Repeats in Pex7 von <i>U. maydis</i>	68
32	Alignment von Pex5-Proteinen verschiedener Organismen.	76
33	Eine Überexpression von <i>pex5b</i> kann den Deletionsphänotyp von <i>pex5a</i> nicht	
	komplementieren.	77
34	Überexpression von Pex5-Chimären.	78
35	Wachstum verschiedener peroxisomaler Mutanten unter dem Einfluss von Öl-	
	säure und Ethanol.	79

Tabellenverzeichnis

1	Intrazelluläre Lokalisierung verschiedener GFP-PTS1-Proteine	23
2	Fördernde und störende Aminosäurereste in getesteten PTS1.	59
3	<i>U. maydis</i> -Proteine mit möglichem PTS2	69
4	Vorhersage der TPRs für Pex5a mittels TPRpred	72
5	Vorhersage der TPRs für Pex5b mittels TPRpred	72
6	Verwendete <i>U. maydis</i> -Stämme	93
7	Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	104
8	Verwendete Plasmide	106

Abkürzungsverzeichnis

ACAD	Acyl-CoA-Dehydrogenase
ACOX	Acyl-CoA-Oxidase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
Cbx	Carboxin
CoA	Coenzym A
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DL	Durchlicht / Hellfeld
DTM	<i>docking/translocation machinery</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD / FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gent / G418	Geneticin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Hyg	Hygromycin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
Leu	Leucin
min	Minute
mPTS	peroxisomale Membrantargeting-Signale
MS	Massenspektroskopie
mTS	mitochondriales Targeting-Signal
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
Nat	Nourseothricin
N-Terminus	Amino-Terminus
NTD	N-terminale Domäne
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen eines Gens
P7-BD	Pex7-Bindedomäne
PBDs	peroxisomal biogenesis disorders
PDB	Protein-Datenbank
Pex	Peroxin, peroxisomales Protein

Pgk	Phosphoglyceratkinase
Phleo	Phleomycin
PMP	Peroxisomales Membranprotein
PTS1	<i>peroxisomal targeting signal type 1 (C-terminal)</i>
PTS2	<i>peroxisomal targeting signal type 2 (N-terminal)</i>
REM	<i>receptor export module</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RING	<i>really interesting new genes</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rotations per minute</i>
s	Sekunde
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
Vol	Volumina
WT	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>

1 Einleitung

1.1 Peroxisomen: Funktion und Biogenese

Peroxisomen sind Organellen von runder Form und werden von einer einfachen Membran begrenzt. Sie kommen in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor; Ausnahmen sind amitochondriale Parasiten wie *Entamoeba* und *Giardia* und die mitochondrien-aufweisenden Apicomplexa [1]. Peroxisomen unterscheiden sich zwischen Organismen, Zelltypen, unter verschiedenen Umgebungsbedingungen und je nach Entwicklungsphase in ihrer Anzahl, Größe und ihrem Proteinrepertoire [2, 3]. Einige Stoffwechselwege sind charakteristisch für Peroxisomen, beispielsweise die β -Oxidation von Fettsäuren, der Abbau von Aminosäuren und Nukleotiden und die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [4, 5, 6].

Weitere Funktionen der Peroxisomen variieren mit ihrem enzymatischen Inhalt je nach Organismus, Zelltyp und Wachstumsbedingungen. In Säugetieren finden essentielle enzymatische Schlüsselschritte der Biosynthese von Plasmalogenen, das sind Etherlipide, die im Gehirn und Nervengewebe vorkommen, in Peroxisomen statt [7]. Pflanzliche Peroxisomen unterscheiden sich in ihrer Funktion je nach Zelltyp und werden drei Kategorien unterteilt: Glyoxysomen, Blattperoxisomen und unspezialisierte Peroxisomen. Alle drei Subtypen enthalten Katalase für die Entgiftung von Wasserstoffperoxid, aber unterscheiden sich in anderen Funktionen. So sind Glyoxysomen während der Keimung von Pflanzensamen vorwiegend im Glyoxylatzyklus und bei der β -Oxidation von Fettsäuren involviert, während Blattperoxisomen an der Synthese von Glycolat bei der Photorespiration beteiligt sind [8, 9]. Auch in Pilzen finden sich Glyoxysomen, die C2-Körper verstoffwechseln [10, 11]. Weitere pilzliche Peroxisomen weisen oftmals unter bestimmten Umständen induzierbare Enzyme auf, beispielsweise solche, die in der Metabolisierung von Methanol [12] oder der Biosynthese von Penicillin [13] involviert sind. Zusätzlich können sich Peroxisomen in filamentösen Pilzen zu Woronin Bodies spezialisieren, die nach Verwundung die Poren der Septen verschließen um einen Austritt von Zytoplasma zu verhindern [14]. Spezialisierte Peroxisomen finden sich auch in Trypanosomen (*Trypanosoma* und *Leishmania*), in denen die glykolytischen Enzyme in Glykosomen kompartimentiert sind [15]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Peroxisomen auch beteiligt sind im Alterungsprozess, in der Virusabwehr und der Autophagie [16, 17, 18, 19].

Die β -Oxidation von Fettsäuren ist in Pflanzen und Hefen ein ausschließlich peroxisomaler Prozess, während in tierischen Zellen Peroxisomen und Mitochondrien kooperieren [20]. Außerdem tragen beide zur zellulären ROS-Homöostase bei, wobei Peroxisomen möglicherweise Einfluss auf die mitochondrialen ROS-Signalwege nehmen [21, 22]. Zusätzlich kooperieren diese beiden Organellen bei der Erkennung und Abwehr von Viren [16] und es wurde ein vesikulärer Transport von Mitochondrien zu Peroxisomen beschrieben [23]. Auch teilen sich Peroxisomen und Mitochondrien Schlüsselkomponenten ihrer Teilungsmaschinerien, was für eine koordinierte Vermehrung dieser Organellen unter bestimmten Bedingungen spricht [24, 25].

Obwohl zunächst vermutet wurde, dass Peroxisomen, ähnlich wie für die Entstehung von Mitochon-

drien und Chloroplasten vorgeschlagen, durch Endosymbiose entstanden sein könnten, sprechen das Fehlen eigener DNA und weitere experimentielle Daten gegen einen solchen endosymbiontischen Ursprung. Stattdessen weist beispielsweise das Targeting einiger peroxisomaler Membranproteine zum endoplasmatischen Retikulum (ER), bevor sie zum Peroxisom sortiert werden, auf eine enge Verbindung zwischen ER und Peroxisomen hin [1, 26]. Neue Peroxisomen entstehen innerhalb einer Zelle durch Teilung vorhandener Peroxisomen, können aber wahrscheinlich auch *de novo*, vom ER ausgehend, gebildet werden [27, 28, 29]. Evolutionär konservierte *PEX* Gene kodieren für zumindest 34 Peroxine, die für die Biogenese der Peroxisomen notwendig sind [30] und die den Zusammenbau, die Teilung und Vererbung dieser Organellen steuern [31, 32].

Von einigen peroxisomalen Membranproteinen konnte gezeigt werden, dass diese die Peroxisomen über das ER erreichen [33, 34, 35]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass das ER die Membran für prä-peroxisomale Strukturen zur Verfügung stellt, der genaue Mechanismus ist aber nicht bekannt [36]. Es wird vermutet, dass der erste Schritt der *de novo*-Entstehung von Peroxisomen am ER beginnt, indem Membranmodulatoren die Membran krümmen. Dadurch bilden sich spezialisierte Subdomänen in der ER-Membran aus, die sich schließlich als sogenannte Prä-Peroxisomen abschnüren. Anschließend werden mithilfe von Pex3, einem peroxisomalen Membranprotein (PMP), und Pex19, einem vorwiegend zytosolisch vorliegendem Peroxin, weitere PMPs in die peroxisomale Membran inseriert [36]. Dabei fungiert Pex19 als Rezeptor und Chaperon für neu synthetisierte PMPs und erkennt dabei spezifische peroxisomale Membrantargeting-Signale (mPTS) [37]. Pex19 dockt anschließend an Pex3 in der peroxisomalen Membran an. Sobald die Matriximportmaschinerie, die aus ungefähr 12 Peroxinen besteht und als Importomer bezeichnet wird [38, 39], vollständig in der peroxisomalen Membran vorliegt, werden peroxisomale Matrixproteine aus dem Zytosol in die Prä-Peroxisomen importiert, wodurch diese zu Peroxisomen maturieren [36].

Neue Peroxisomen können auch durch Teilung bereits vorhandener Peroxisomen entstehen, wobei unklar ist, welcher Mechanismus bevorzugt wird und wie diese Teilung im Detail verläuft. Zum einen gibt es Beobachtungen, dass beide durch Teilung entstandene Tochterperoxisomen denselben Proteininhalt vererbt bekommen und dass die *de novo*-Bildung der bevorzugte Weg für die Biogenese in Säugetierzellen ist [33]. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Matrixproteine des mütterlichen Peroxisoms ungleichmäßig auf die Töchter verteilt werden und dass Peroxisomen in Säugetierzellen vorwiegend durch Wachstum und anschließende nicht symmetrische Teilung vorhandener Peroxisomen entstehen [40]. Auch in Hefezellen wird der Matrixinhalt vorhandener Peroxisomen nach Teilung ungleichmäßig auf die Töchter verteilt [41, 42]. Zusätzlich gibt es Beobachtungen, dass vorhandene Peroxisomen über das ER beständig mit PMPs beliefert werden [34, 35, 36].

Im Menschen führen Defekte der Peroxisomenbiogenese zu Störungen des Imports essentieller Enzyme in diese Organellen, wodurch eine Reihe von Krankheiten ausgelöst wird, die als *peroxisomal biogenesis disorders* (PBDs) bezeichnet werden [43, 44, 45]. Das Zellweger Syndrom ist eine Erbkrankheit, die durch das Fehlen von Peroxisomen bzw. durch das Vorliegen einer peroxisomalen Dysfunktion gekennzeichnet ist. In den Zellen reichern sich sehr langkettige Fettsäuren an und zusätzlich kann

kein Plasmalogen synthetisiert werden, welches für die Myelinbildung der Nervenzellen essentiell ist [46, 47]. Daher verläuft diese Erbkrankheit in der Regel tödlich [48, 49, 50].

1.2 Import peroxisomaler Matrixproteine

Im Gegensatz zu Importmechanismen anderer Organellen werden peroxisomale Proteine als vollständig gefaltete und oligomerisierte Proteine importiert [51, 52, 53]. Die peroxisomalen Matrixproteine werden im Zytosol an freien Ribosomen translatiert und tragen peroxisomale Importsignale, die von zytosolischen Importrezeptoren erkannt werden [54]. Diese Importrezeptoren sind lösliche Proteine, die zwischen dem Zytosol und den Peroxisomen pendeln [55, 56]. In Metazoa und in Pilzen tragen die meisten peroxisomalen Matrixproteine ein peroxisomales Targetingsignal vom Typ 1 (PTS1), während in Pflanzen zahlreiche peroxisomale Proteine über den PTS2-abhängigen Importweg in die Peroxisomen gelangen [57]. In Metazoa und Pflanzen ist Pex5 der zentrale Importrezeptor, da sowohl PTS1- als auch PTS2-Proteine von diesem transportiert werden [58, 59, 60, 61, 62]. Dabei ist die Interaktion von Pex5 mit den PTS1-Proteinen direkt [63, 64, 65, 66, 67], wohingegen für die Interaktion zwischen Pex5 und PTS2-Proteinen das zusätzliche Adapter-Protein Pex7 benötigt wird [62, 68, 69]. In Hefen und Pilzen dagegen werden PTS2-Proteine von einem Komplex aus Pex7 und spezie-spezifischen Mitgliedern aus der Pex20-Familie ohne Mitwirkung von Pex5 ins Peroxisom importiert [69, 70, 71, 72, 73].

Der Import von Matrixproteinen kann in vier Schritte gegliedert werden: (1) Bindung des Rezeptors an sein Cargo, (2) Docking des Rezeptor-Cargo-Komplexes an die peroxisomale Membran, (3) Translokation des Cargos über die peroxisomale Membran und Entlassung in die peroxisomale Matrix und (4) Recycling des Rezeptors [74] (Abbildung 1). (1) Peroxisomale Matrixproteine weisen PTS-Sequenzen auf, wobei diese Regionen partiell ungefaltete sind und von den zytosolischen Chaperonen Hsp70 oder Hsp40 stabilisiert werden, damit das PTS für den Rezeptor zugänglich ist [75, 76, 77]. Nachdem die PTS1- und PTS2-Proteine im Zytosol von den Rezeptoren Pex5 bzw. von Pex7 und dem PTS2-Co-Rezeptor gebunden wurden, (2) interagieren die Rezeptoren mit der peroxisomalen *docking/translocation machinery* (DTM) [78, 79, 80, 81]. DTM ist ein Transmembran-Proteinkomplex bestehend aus Pex13, Pex14 und den RING-Finger Peroxinen Pex2, Pex10 und Pex12 [82, 83]. (3) Dem initialen Docking folgt die Inserierung der Rezeptor-Cargo-Komplexe in die DTM, woraufhin das Cargo-Protein in das Organellenlumen entlassen wird [84, 85, 86]. Dabei verbleiben die Rezeptoren Pex5 und Pex7 eingebettet in der DTM [87, 88, 89]. Für *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Pex5 zusammen mit Pex14 eine transiente Pore ausbildet, über die die Cargo-Proteine transportiert werden [90]. (4) Nach dem Cargo-Translokations-Schritt werden die Rezeptoren ins Zytosol entlassen und recycelt; sowohl der Rezeptor als auch die DTM stehen für weitere Importrunden zur Verfügung.

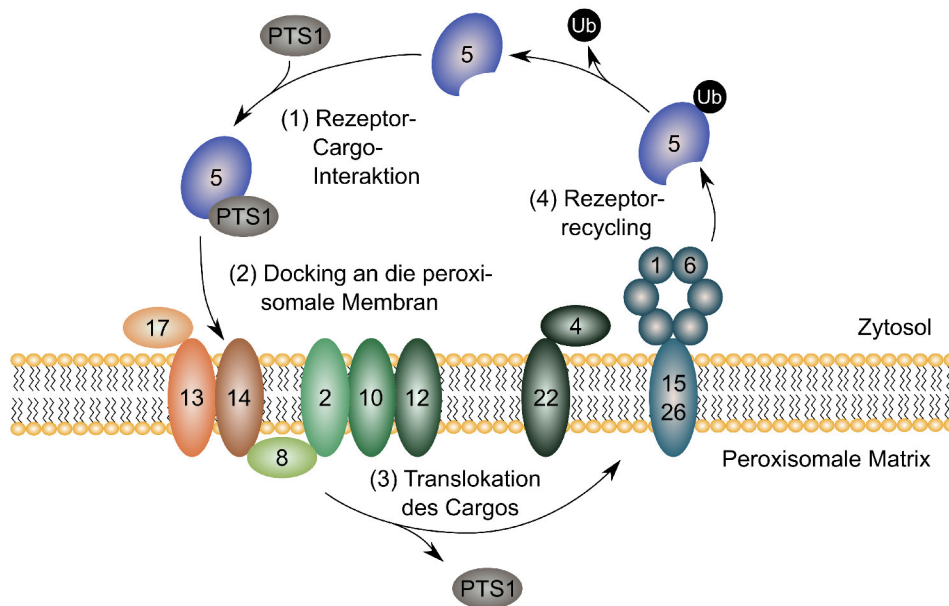


Abbildung 1: Import von PTS1-Proteinen aus dem Zytosol in die Peroxisomen

(1) Der peroxisomale Importrezeptor Pex5 erkennt und bindet peroxisomale Matrixproteine über ihr PTS1-Motiv im Zytosol. (2) Mit Cargo-beladene Pex5-Proteine interagieren mit dem Docking-Komplex, bestehend aus Pex13, Pex14 und in Hefe Pex17, und bilden eine transiente Pore aus. (3) Durch Interaktion mit dem Docking- und dem RING-Komplex (Pex2, Pex10, Pex12) erfolgt die Entlassung des Cargos in die peroxisomale Matrix. (4) Anschließend wird der Rezeptor durch Pex4 (membranverankert über Pex22) mono-ubiquitiniert (Ub) und über den Export-Komplex (Pex1, Pex6, Pex15 in Hefen, Pex26 in Säugetieren) zurück ins Zytosol entlassen. Abschließend wird das Ubiquitin entfernt und der Rezeptor steht für eine neue Importrunde zur Verfügung.

1.2.1 PTS1-Import

Der Rezeptor Pex5 ist - unabhängig vom Organismus - für den Import löslicher Proteine vom Zytosol ins Peroxisom von entscheidender Bedeutung. In Metazoa und in Pilzen trägt der Großteil der für das peroxisomale Lumen bestimmter Proteine ein PTS1 und ist damit von Pex5 abhängig. In den gut charakterisierten Modellorganismen *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Phaedactylum tricornutum* werden sogar alle peroxisomalen Matrixproteine über Pex5 importiert [91, 92, 93]. Zusätzlich fungiert in Säugetieren die längere Isoform von Pex5, Pex5L, als Co-Rezeptor zu Pex7 im PTS2-Importweg [62, 68, 69] und auch in Pflanzen stabilisiert Pex5L die Interaktion von Pex7 und PTS2-Proteinen [61, 94, 95].

Der lösliche Rezeptor Pex5 erkennt sein im Zytosol vorliegendes Cargo über ein Targeting-Signal und transportiert es im Folgenden zum Peroxisom, wo es in die Matrix dieses Organells entlassen wird [96, 97, 98, 99, 100, 101, 102]. Der Konsensus des peroxisomalen Targeting-Signals PTS1 ist ein C-terminales Tripeptid mit der kanonischen Sequenz Serin-Lysin-Leucin (SKL) oder konservierten Varianten davon [103], wobei mehr als die letzten drei Aminosäuren am C-terminalen Ende des Cargos die Bindung zum Rezeptor beeinflussen [104] und das Motiv des PTS1 in Bezug auf Länge und Sequenz zwischen verschiedenen Spezies variiert [105, 106].

Pex5 selbst besteht aus einer N-terminalen Docking-Domäne und einer C-terminalen konservierten

Domäne, die für die Interaktion mit dem PTS1 essentiell ist [107]. Die C-terminale Domäne von Pex5 besteht aus sieben Tetratricopeptid-Repeats, die eine Bindetasche für das PTS1 ausbilden. Die Kristallstruktur der TPR-Domäne von Pex5 im Komplex mit einem PTS1 (PDB: 1FCH) enthüllt zwei TPR-Triplets, die, vermittelt über das mittlere TPR-Motiv, zueinander geklappt sind, wodurch eine ringförmige Anordnung entsteht, in deren Mitte das PTS1 aufgenommen wird (Abbildung 2) [108].

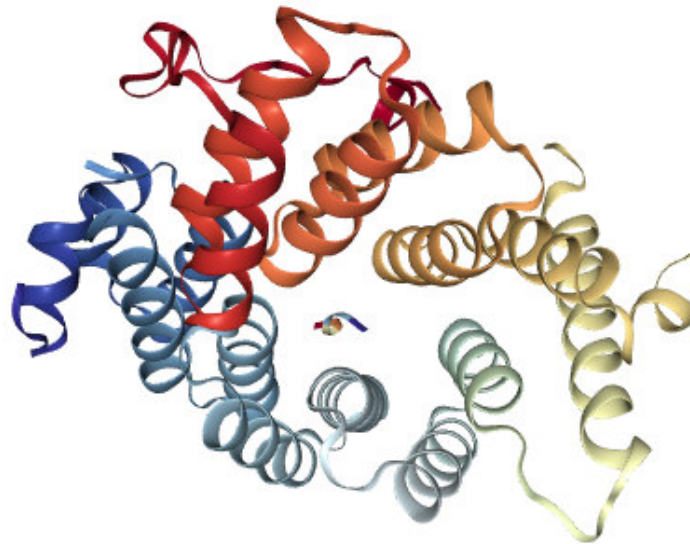


Abbildung 2: **Struktur der TPR-Domäne von Pex5 von *Homo sapiens* mit gebundenem PTS1.** Die von Gatto *et al.* 2000 publizierte Kristallstruktur (PDB: 1FCH) zeigt die Interaktion eines Pentapeptids, welches ein PTS1 enthält (Mitte des Bildes), und der C-terminalen Domäne von Pex5 aus *H. sapiens*. Die TPR-Domäne besteht aus sechs TP-Repeats (regenbogen-farben), die eine Bindetasche formen und mit dem PTS1 interagieren, und einem mittleren, TPR-ähnlichen Motiv (gelb), welches die beiden TPR-Triplets zueinander klappt [108].

Nachdem Pex5 sein Cargo im Zytosol gebunden hat, dockt der Rezeptor an Pex14 oder Pex13 in der peroxisomalen Membran an [109, 110]. Dabei interagiert Pex5 mit den Membranproteinen über seine in der N-terminalen Domäne (NTD) vorhandenen WxxxY/Y-Motive [111]. Daraufhin wird der initial lösliche Rezeptor ein integraler Bestandteil der peroxisomalen Membran, wobei eine Pore, bestehend aus Pex5 und Membranproteinen, ausgebildet wird [90]. Dieser Schritt der Insertion von Pex5 in die DTM ist ATP-unabhängig aber abhängig von der Bindung des Cargos [84, 86, 112, 113], wobei auch die Größe der Pore vom Cargo bestimmt wird und einen Durchmesser bis zu 9 nm aufweisen kann [90]. Zu diesem Zeitpunkt weist Pex5 eine Transmembrantopologie auf, wobei das N-terminale Ende ins Zytosol ragt, aber der Großteil des Proteins sich in der peroxisomalen Matrix befindet [56, 87, 88]. Die Interaktion zwischen der N-terminalen Region von Pex5 mit dem Docking-Komplex könnte eine Konformationsänderung in der TPR-Domäne hervorrufen und so das Entlassen des Cargos in die peroxisomale Matrix auslösen [63, 114]. Anschließend wird Pex5 an einem konservierten Cystein-Rest nahe des N-Terminus mono-ubiquitiniert [115, 116, 117], wodurch die Extraktion von Pex5 aus der DTM ausgelöst wird. Dieser Vorgang ist ATP-abhängig und wird vom Rezeptor-Export-Modul (REM), bestehend aus den zwei ATPasen Pex1 und Pex6 und deren Membrananker, durchgeführt [112].

[115, 118, 119, 120]. Der letzte Schritt im Recycling des Rezeptors ist das Entfernen des Ubiquitins, wahrscheinlich durch sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Reaktionen [121, 122, 123]. Anstelle des Recyclings in das Zytosol kann auch ein Abbau von Pex5 erfolgen; die Degradierung durch das Proteasom wird eingeleitet durch die Poly-Ubiquitinierung eines konservierten Lysin-Rests in der Nähe des N-terminalen Endes von Pex5 [70, 116, 120, 124].

Je nach Organismus gibt es häufig weitere Pex5-Proteine, die für den Import von PTS1-Proteinen zur Verfügung stehen. In Säugetieren wurden zwei verschiedene Spleißvarianten des *PEX5*-Gens identifiziert; eine kurze (Pex5S) und eine lange Form (Pex5L), die sich in einer Insertion von 37 Aminosäureresten unterscheiden [125]. In Hamsterzellen wurden sogar drei Isoformen von Pex5 entdeckt (Pex5S, Pex5M, Pex5L) [126]. Alle Isoformen sind in der Lage, PTS1-Proteine ins Peroxisom zu transportieren, aber nur Pex5L kann, aufgrund der 37 Aminosäure-Insertion, mit Pex7 interagieren und spielt eine Rolle beim Import von PTS2-Proteinen [58, 60, 62, 125]. Die Situation in Pflanzen ist ähnlich: Reis weist zwei Isoformen von Pex5 auf, wobei die längere ebenfalls am PTS2-Import beteiligt ist [127]. In *Arabidopsis thaliana* kommt nur eine Version von Pex5 vor; diese entspricht der längeren Isoform von Pex5L in Säugetieren und agiert sowohl im PTS1- als auch im PTS2-Importweg [61]. In der Hefe *S. cerevisiae* wurde kürzlich ebenfalls ein weiterer PTS1-Rezeptor charakterisiert. Das als Pex9p bezeichnete Protein importiert auf gleiche Weise wie Pex5p PTS1-Proteine ins Peroxisom, erkennt allerdings nur eine Minderheit an PTS1-Proteinen [128, 129]. Auch der Basidiomycet *Ustilago maydis* kodiert für zwei Pex5-Rezeptoren [130], die in dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

1.2.2 PTS2-Import

PTS2-Proteine werden vom Rezeptor Pex7 erkannt und gebunden. Pex7 gehört zur WD40-Proteinfamilie, deren Mitglieder eine charakteristische Form gemeinsam haben und die innerhalb der Eukaryoten gut konserviert ist [131]. WD40-Domänen, die aus WD40-Repeats bestehen, kommen in zahlreichen Proteinen mit verschiedenen biologischen Funktionen vor, die sich von Signaltransduktion, Transkriptregulation und Zellzyklus-Kontrolle bis zu Autophagie und Apoptose erstrecken [132]. Ein WD40-Repeat besteht aus ungefähr 40 Aminosäuren und endet meistens auf Trp-Asp (WD). Gefaltet wird ein WD-Repeat zu β -Faltblättern, die anti-parallel angeordnet sind [133]. Pex7 besteht aus einem N-Terminus, der nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu anderen WD40-Motiven aufweist, aber eine WD40-ähnliche Faltung annehmen kann, und sechs WD-Repeats; zusammen bilden diese eine siebenblättrige Propeller-Struktur aus [134] (Abbildung 3).

Pex7 benötigt für seine Funktion als PTS2-Importrezeptor immer einen Co-Rezeptor [69]. In Säugetieren, Pflanzen, einigen Pilzen und einigen primitiven Eukaryoten wie *Trypanosoma*, *Leishmania* und *Dictyostelium* fungiert der PTS1-Rezeptor Pex5 als Co-Rezeptor im PTS2-Importweg [58, 59, 60, 61, 62, 136]. In Hefen und anderen Pilzen übernehmen spezie-spezifische Vertreter der Pex20-Proteinfamilie die Funktion des Co-Rezeptors [69, 70, 71, 72, 73, 137]. Die Pilze *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* und *Neurospora crassa* weisen Pex20 auf [70, 71, 73, 137], während die Hefen *Candida glabrata* und *S. cerevisiae* für Pex18 und Pex21 kodieren [72, 138]. In

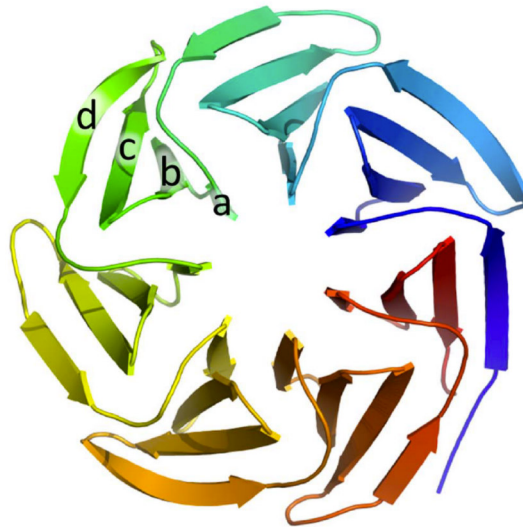


Abbildung 3: Die klassische Tertiärstruktur einer WD40-Domäne.

WD40-Proteine bestehen aus WD40-Repeats, die sich zu WD40-Blättern falten und eine WD40-Domäne ausbilden. Die konservierte Struktur einer WD40-Domäne gleicht einer siebenblättrigen Propellerstruktur. Ein WD40-Blatt setzt sich zusammen aus a, b, c und d wie abgebildet, wobei ein WD40-Repeat anders definiert ist (d, a, b, c). Abbildung aus Wang *et al.*, 2013 [135].

S. cerevisiae weisen die Paraloge Pex18p und Pex21p nur 23 % Sequenzidentität auf [69], aber beide Proteine können mit Pex7 interagieren, wobei am Import von Fox3p bevorzugt Pex18p beteiligt ist [72] während Pex21p als Co-Rezeptor beim Import des PTS2-Proteins Gdp1p fungiert [139].

In Säugetieren finden sich keine Homologe zu Mitgliedern der Pex20-Familie, die N-terminale Domäne (NTD) der langen Isoform von Pex5 (Pex5L) aber weist funktionelle Ähnlichkeiten zu Proteinen der Pex20-Familie auf [68, 69, 140]. Das Sequenz-Alignment der NTD des humanen Proteins Pex5L und den Mitgliedern der Pex20-Familie, Pex18, Pex21 und Pex20, zeigt drei konservierte Regionen [69]. Zum einen weisen alle PTS2-Co-Rezeptoren eine Pex7-Bindedomäne (P7-BD) auf, die aus 20 bis 30 Aminosäure-Resten besteht, die höchstwahrscheinlich eine amphipathische α -Helix formen. Im Menschen und anderen Säugetieren besitzt nur die lange Isoform von Pex5, Pex5L, diese Domäne [68]. Weiterhin weisen PTS2-Co-Rezeptoren eine Domäne bestehend aus ungefähr 30 Aminosäure-Resten nahe am N-Terminus und ein oder mehrere di-aromatische Pentapeptid-Repeats (WxxxF/Y) auf [69]. Überraschenderweise finden sich diese drei konservierten Domänen auch in einem Protein des Humanpathogens *Cryptococcus neoformans* und des Pflanzenpathogens *U. maydis*. Diese beiden Basidiomyceten besitzen im Gegensatz zu vielen anderen Pilzen keinen Vertreter der Pex20-Proteinfamilie, sondern die jeweiligen PTS1-Rezeptoren Pex5 weisen eine P7-BD und die anderen beiden konservierten Domänen auf; dies legt die Vermutung nahe, dass nicht nur in Säugetieren und in Pflanzen, sondern auch in einigen Pilzen Pex5 sowohl als PTS1- als auch als PTS2-Co-Rezeptor fungiert [69, 138].

Proteine, die von Pex7 und einem Co-Rezeptor erkannt und gebunden werden [141], tragen ihre Zielsteuerungssequenz, das PTS2-Motiv, nahe an ihrem N-terminalen Ende. Die konservierte Nonapeptid-Sequenz ist von ursprünglich RLx5HL [142] zu R/K-L/V/I/Q-X-X-L/V/I/H/Q-L/S/G/A/K-X-H/Q-

L/A/F erweitert worden [143]. Die PTS2-Domäne bildet eine α -helikale Konformation, in welcher alle wichtigen Reste ihre Seitenketten in dieselbe Richtung orientieren und eine flexible Linker-Domäne die PTS2-Helix mit dem Core-Protein verbindet [144].

Das PTS2-Motiv bildet zusammen mit Pex7 und dem Co-Rezeptor einen trimären Proteinkomplex. Die Interaktion von PTS2 und Pex7 erfolgt dabei über eine evolutionär konservierte Furche oberhalb der kegelförmigen WD-40-Struktur von Pex7. Diese Furche ist nicht nur die Bindestelle der PTS2-Helix, sondern über diese erfolgt auch die Interaktion mit dem Co-Rezeptor (Abbildung 4) [134, 144]. In Säugetierzellen ist die PTS2-Pex7-Interaktion relativ schwach und erst durch Bindung von Pex5L an diesen Komplex wird diese stabilisiert [89, 145]. Auch in *S. cerevisiae* ist der Komplex aus Pex7, Co-Rezeptor und Cargo nur als trimärer Komplex stabil [134], wodurch vermutlich verhindert wird, dass ungeladene Rezeptormoleküle nutzlose Importrunden durchlaufen [145]. Der Pex7-PTS2-Co-Rezeptor-Komplex wird während der Insertion in die peroxisomale Membran aufgelöst und setzt Pex7-PTS2 frei, wodurch möglicherweise im Folgenden das Entlassen des Cargos in die peroxisomale Matrix ausgelöst wird [89, 134].

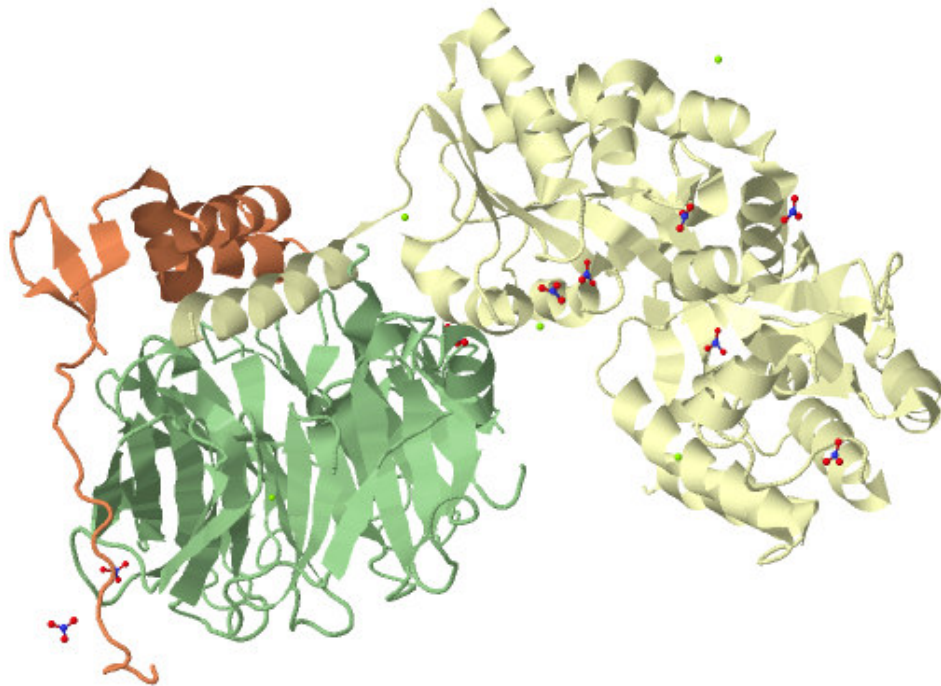


Abbildung 4: **Struktur der PTS2-Domäne von 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase im Komplex mit Pex7p und Pex21p von *S. cerevisiae*.**

Die von Pan *et al.* 2013 publizierte Kristallstruktur (PDB: 3W15) zeigt das PTS2 des peroxisomalen Matrixproteins 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (altweiß) im Komplex mit den Importrezeptoren Pex7p (grün) und (dem C-terminalen Part von) Pex21p (orange) in *S. cerevisiae*; Nitrat- (rot/blau) und Magnesiumionen (grün). Sowohl Fox3p als auch Pex21pC binden die Oberfläche von Pex7p, wodurch die aliphatischen Reste von allen drei Proteinen einen hydrophoben Kern ausbilden. Die aliphatischen Seitenketten sind evolutionär konserviert und die hydrophobe Interaktion dieser Aminosäuren könnte von entscheidender Bedeutung für die Stabilität des ternären Komplexes sein [134].

Ebenso wie Pex5 im PTS1-Importweg bindet Pex7 gefaltete und oligomere Proteine [146, 147, 148, 139]. Im Folgenden interagieren die PTS2-Co-Rezeptoren - ebenso wie Pex5 im PTS1-Importweg - über di-aromatischen Pentapeptid-Repeats (WxxxF/Y) mit dem Docking-Komplex, den Membranperoxinen Pex13 [149] bzw. Pex14 [109, 150]. In einigen Organismen bindet Pex7 auch in Abwesenheit der Co-Rezeptoren an den Docking-Komplex [70, 150]. Ähnlich wie Pex5 verbleibt Pex7 während des Translokationsvorganges des PTS2-Cargos an der DTM [89], wobei zumindest der N-Terminus von Pex7 ins Zytosol ragt [151]. Die PTS2-Rezeptoren gleichen der NTD von Pex5, die an der Porenbildung im PTS1-Importweg beteiligt ist [69, 124, 140]. Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die PTS2-Importpore aus Pex18 und dem Pex14/Pex17-Heterodimer besteht und konstitutiv ca. 4,7 nm weit geöffnet ist [152], aber auch schnell wieder aufgelöst wird [72, 124, 153]. Von *S. cerevisiae* weiß man außerdem, dass die PTS1- und PTS2-Importwege getrennte Poren nutzen [152] - dies ist nicht bekannt für Zellen, die Pex5 sowohl für den PTS1- als auch den PTS2-Importweg nutzen.

Im Gegensatz zu PTS1-Proteinen wird das PTS2-Motiv in Säugetieren und in Pflanzen von den peroxisomalen Matrixpeptidasen Tysnd1 bzw. Deg15 abgespalten [154, 155, 156]. Die Prozessierung des PTS2 ist aber keine notwendige Voraussetzung für die Ablösung des Cargos von Pex7, verhindert aber möglicherweise die Reassoziierung von PTS2-Proteinen in der peroxisomalen Matrix mit Pex7 in der peroxisomalen Membran [89]. Aber auch durch die schnelle Freisetzung von Pex7 aus der DTM könnte der Grund für die Irreversibilität des PTS2-Imports sein [89]. Nach dem Entladen wird Pex7 ins Zytosol entlassen und steht für weitere Importrunden zur Verfügung [56]. Auch der PTS2-abhängige Importprozess ist ATP-abhängig [146].

1.2.3 PTS-unabhängiger Import

Überraschenderweise finden sich in der peroxisomalen Matrix auch Proteine, die kein kanonisches peroxisomales Targeting-Signal aufweisen. Proteine ohne PTS können sich zunutze machen, dass das peroxisomale Translokon auch Proteinoligomere über die peroxisomale Membran transferieren kann [51, 52, 53, 157, 158]. Beim sogenannten Piggy back-Import interagieren Proteine im Zytosol mit einem PTS-tragenden Protein und werden als Teil dieses oligomeren Komplexes ins Peroxisom transportiert. *S. cerevisiae* Eci1p weist zwar ein eigenes und funktionelles PTS1 auf, im Komplex mit seinem Partner, dem Protein Dci1p, wird aber dessen PTS1 erkannt und beide Proteine werden als Heterooligomer in die Peroxisomen transportiert [159]. Auch in Säugerzellen gibt es den Mechanismus des Piggy back: Das Enzym SOD1 enthält kein eigenes PTS, wird aber im Komplex mit seinem Interaktionspartner CCS über den Piggy back-Mechanismus in die peroxisomale Matrix importiert [160]. Auch die PTS2-Importmaschinerie kann Proteinkomplexe importieren, wobei nur ein Targeting-Signal genutzt wird. Eines der beiden bekannten PTS2-Proteine in *S. cerevisiae*, Gpd1p, wird von Pex7 zusammen mit dem Co-Rezeptor Pex21p gebunden und importiert - Gpd1p bildet dabei einen heterodimeren Komplex mit Pnc1p, welches kein eigenes PTS aufweist [139].

Eine andere Möglichkeit für den Transport von Proteinen über die peroxisomale Membran in Abwesenheit eines PTS1 oder PTS2 ist die direkte Interaktion mit dem Importrezeptor Pex5 an einer

Stelle außerhalb der PTS1-Bindedomäne. In *S. cerevisiae* ist die NTD von Pex5p ausreichend, um den Import des PTS-losen Proteins Fox1p ins Peroxisom zu ermöglichen, wobei die Interaktionsstelle im zentralen Teil des Proteins Fox1p liegt [66, 140]. Auch die Katalase Cat2p wird in *S. cerevisiae* auf diesem Wege importiert, wobei Cat2p an einer anderen Stelle als Fox1p innerhalb der NTD von Pex5p bindet [66, 161]. Ebenso interagiert die Alkohol-Oxidase in *H. polymorpha* mit der NTD von Pex5p um ins Peroxisom zu gelangen [65]. Auch in Pflanzen beobachtet man Pex5-abhängige, aber PTS1-unabhängige Translokation ins Peroxisom: In *A. thaliana* interagiert Katalase mit der NTD von Pex5p [67] und benötigt für die Bindung ein internes Bindemotiv nahe des C-terminalen Endes (-13 bis -11) [162]. Auch in Säugetierzellen interagiert Katalase trotz eines vorhandenen PTS1-Motivs zusätzlich mit der NTD von Pex5 [63].

1.3 β -Oxidation von Fettsäuren in *U. maydis*

In *U. maydis* kommt den Peroxisomen eine wichtige Rolle im Abbau von Fettsäuren zu. In Pflanzen und Hefen findet die β -Oxidation von Fettsäuren ausschließlich im Peroxisom statt, wohingegen in Säugetieren und dem Pilz *U. maydis* der Fettsäureabbau kooperativ in Peroxisomen und Mitochondrien stattfindet [20, 163]. Ähnlich wie in menschlichen Zellen werden in den Peroxisomen von *U. maydis* vorwiegend langkettige, verzweigte und ungesättigte Fettsäuren abgebaut, wohingegen in den Mitochondrien kurz- und mittelkettige Fettsäuren oxidiert werden [163]. Die im Peroxisom gekürzten Fettsäuren werden anschließend auf das Trägermolekül Carnitin übertragen und zum Mitochondrium gesendet, wo sie vollständig oxidiert werden. Für die koordinierte Regulation des Fettsäuremetabolismus in beiden Organellen stehen Peroxisomen und Mitochondrien in einer engen Wechselbeziehung [163, 164, 165, 166, 167].

Initialer Schritt der β -Oxidation von Fettsäuren ist deren Aktivierung, wobei diese an Coenzym A konjugiert werden. Anschließend werden die Fettsäuren über ABC-Transporter in die Peroxisomen importiert [168]. In *U. maydis* kodieren die Gene *um03945* und *um01105* für Homologe der Transporter Pxa1p und Pxa2p aus Hefe bzw. ABCD1 und ABCD2 aus Säugetieren [163].

In *U. maydis* enthalten sowohl die Mitochondrien als auch die Peroxisomen alle für die β -Oxidation von Fettsäuren benötigten Enzyme. Im ersten Schritt des mitochondrialen Fettsäureabbaus katalysiert eine Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD) die Oxidation von Acyl-CoA, wobei durch Transfer von Elektronen auf FAD FADH_2 gebildet wird. Dieses wird anschließend in der Atmungskette für die Produktion von ATP verwendet. Im Gegensatz dazu werden im ersten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation durch Acyl-CoA-Oxidasen (ACOX) Elektronen auf FAD und anschließend von FADH_2 auf O_2 transferiert, wodurch Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die Entgiftung des Wasserstoffperoxids erfolgt durch das Enzym Katalase, die H_2O_2 zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umsetzt.

Camões *et al.* fanden in einer bioinformatischen Suche in *U. maydis* vier Kandidaten für ACOXs und sieben ACADs [163]. Drei der vier Enzyme, die mutmaßlich den ersten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation katalysieren, weisen ein PTS1 auf (*Um01966*, *Um02028*, *Um02208*), wohingegen *um04324* weder für ein PTS1 noch ein PTS2 kodiert. Interessanterweise ist für dieses Protein das

Fehlen eines PTS innerhalb der Pilze konserviert [163]. Für das *S. cerevisiae* Homolog Pox1p und *Y. lipolytica* Enzym konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Protein ohne PTS1 aber Pex5-abhängig in die Peroxisomen importiert wird [140, 169]. Vier der sieben vorhergesagten ACADs weisen ebenfalls PTS1-Motive auf: Um10665, Um01466, Um06400 und Um00122 [163]. Für die weiteren Schritte der mitochondrialen β -Oxidation finden sich ebenfalls Homologe in *U. maydis*, wobei keines davon ein peroxisomales Targeting vermuten lässt [163].

In Säugetieren wird der zweite und dritte Schritt der peroxisomalen β -Oxidation von zwei phylogenetisch unverwandten multifunktionellen Enzymen katalysiert [4]. In *U. maydis* findet sich nur ein multifunktionelles Enzym (Um10038), welches kein PTS aufweist [163]. Stattdessen kodiert *U. maydis* für PTS1-tragende Enoyl-Hydratasen (Um01747, Um02097, Um11001) und eine 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (Um10825), die vermutlich dieselben Reaktionen wie das multifunktionelle Enzym katalysieren [163].

Der vierte und letzte Schritt des peroxisomalen Fettsäureabbaus wird von einer 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase katalysiert, wovon *U. maydis* zwei Homologe aufweist: Um01090 (PTS2) und Um02715 (kein PTS). Die Funktion der Thiolase kann in Säugetieren eine peroxisomale Isoform des Sterol-Carrier-Proteins (SCP) übernehmen. Auch von diesem findet sich in *U. maydis* ein Homolog (Um01986 - kein PTS). Dieses Enzym weist keine SCP-Domäne auf; diese findet sich aber in den Enzymen Um11938 (PTS1) und Um01850 (PTS1) [163].

Ähnlich wie in Säugetieren weist auch *U. maydis* ein vollständiges Repertoire an Enzymen auf um die peroxisomale und mitochondriale β -Oxidation kooperativ ausführen zu können [163]. In *U. maydis* ist der Fettsäureabbau im Mitochondrium dabei spezifisch für gesättigte kurz- und mittelkettige Fettsäuren, während im Peroxisom gesättigte und ungesättigte und kurz- bis zu langkettigen Fettsäuren verstoffwechselt werden [163, 170, 171]. Die große Anzahl an potentiellen ACOXs und ACADs lässt vermuten, dass einzelne Enzyme eine Substratspezifität entwickelt haben, was das große Spektrum der im Peroxisom verstoffwechselten Fettsäuren erklären könnte [163].

1.4 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Der Basidiomycet *U. maydis* eignet sich in vielerlei Hinsicht als Modellorganismus, da dieser Pilz die Vorteile einzelliger Organismen mitbringt, aber auch viele wichtige Prozesse mit menschlichen Zellen teilt [172]. Ein genom-weiter Vergleich zwischen den Pilzen *U. maydis* und *S. cerevisiae* mit *H. sapiens* zeigte, dass sich Basidiomycet und Mensch in Bezug auf ihre Proteinsequenzen ähnlicher sind als *H. sapiens* und die Bäckerhefe. Außerdem fehlen eine große Anzahl jener Proteine, die *U. maydis* mit dem Menschen gemeinsam hat, in *S. cerevisiae* vollständig. Einige dieser Proteine wurden bereits mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht, während von einem Großteil bisher keine biologische Funktion bekannt ist [173].

Zusätzlich stehen für *U. maydis* eine große Anzahl molekularbiologischer, bioinformatischer und zellbiologischer Techniken zur Verfügung und das Genom ist sequenziert und publiziert [174]. Der phytopathogene Pilz infiziert, um seinen Lebenszyklus durchlaufen zu können, seinen Wirt Mais oder

die ursprüngliche Form des Maises Teosinte. Da *U. maydis* alle grünen Teile seiner Wirtspflanzen befallen kann, können bereits junge Maispflanzen im Gewächshaus infiziert werden, wonach innerhalb kurzer Zeit markante Symptome sichtbar werden [175]. Dadurch eignen sich *U. maydis* und Mais sehr gut um Pilz-Pflanzen-Interaktionen zu studieren [174, 176, 177, 178]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* die Haarwurzeln des Schneckenklees *Medicago truncatula* infizieren kann, wobei der Pilz nach Penetration zwischen den epidermalen Wurzelzellen inter- und intrazelluläre Pseudohyphen ausbildet. *M. truncatula* ist ein Modellorganismus zum Studium von Wurzelsymbiosen und eine Infektion mit *U. maydis* könnte neue Einblicke in die Interaktion zwischen Wurzel und Mikroorganismus gewähren [179]. Auch für zellbiologische Studien wurde *U. maydis* herangezogen, beispielsweise für die Untersuchung des Langstreckentransports entlang von Mikrotubuli, des polaren Wachstums und der offenen Mitose, da diese Prozesse mit denen in höheren Eukaryoten vergleichbar sind, während sie in Ascomyceten teilweise fehlen [172]. Die bahnbrechenden Studien zum molekularen Mechanismus der DNA-Reparatur und Rekombination von Robin Holliday wurden teilweise an *U. maydis* durchgeführt [180] und noch heute wird dieser Pilz für Untersuchungen von Prozessen an der DNA genutzt. So eignet sich *U. maydis* als Modellorganismus für Telomerstudien, da dieser Pilz identische Telomer-Repeat-Units wie Säugetiere und auch die Kernkomponenten für den Mechanismus des *homology-directed repair* (HDR), der für Aufrechterhaltung der Telomere wichtig ist, aufweist [181].

Auch in der Funktion und der Transportmaschinerie der Peroxisomen ähnelt *U. maydis* den Säugerzellen. In dem Basidiomyceten zeigen die Peroxisomen zweierlei Bewegungen. Zum einen „Wackeln“ die Peroxisomen und zum anderen können sie über längere Strecken in der Zelle transportiert werden, wobei der Langstreckentransport Energie benötigt und für die homogene Verteilung dieser Organellen innerhalb der Zelle essentiell ist [182]. Die β -Oxidation von Fettsäuren läuft in Säugerzellen sowohl im Peroxisom als auch im Mitochondrium ab, während in Hefe der Abbau von Fettsäuren ausschließlich im Peroxisom stattfindet [20]. Einige Pilzspezies weisen im Gegensatz zu *U. maydis* nur ein unvollständiges Set mitochondrialer β -Oxidationsenzyme auf [183], was diesen Basidiomyceten zu einem geeigneten Modellsystem macht um die metabolische Kooperation zwischen Peroxisomen und Mitochondrien zu studieren [163].

1.5 Fragestellung

Basidiomyceten wie *U. maydis* und *C. neoformans* kodieren für zwei Pex5-ähnliche PTS1-Rezeptoren [138]. Der Phänotyp einer Deletionsmutante von *pex5b* ist in *U. maydis* deutlich stärker ausgeprägt als der einer Deletion von *pex5a*: Beide Mutanten zeigen ein reduziertes Wachstum auf Ölsäure-haltigem Agar und verminderte Virulenz, wobei jedoch $\Delta pex5b$ -Stämme kaum noch filamentös wachsen und nahezu apathogen sind [130]. Die unterschiedlichen Phänotypen nach Einzeldelationen von *pex5a* und *pex5b* ließen die Schlussfolgerung zu, dass sich die beiden Proteine in ihrer Funktion beim peroxisomalen Import voneinander unterscheiden müssen. In dieser Arbeit stand die Charakterisierung der *U. maydis* PTS1-Rezeptoren Pex5a und Pex5b im Vordergrund. Zum einen sollte untersucht werden, ob die beiden PTS1-Rezeptoren unterschiedliche Cargos erkennen und zum anderen war von Interesse, weshalb *U. maydis* für zwei unterschiedliche Pex5-Proteine kodiert.

2 Ergebnisse

2.1 In *U. maydis* ist Pex5b am Pex7-abhängigen Import von PTS2-Proteine beteiligt

In den meisten Organismen machen PTS2-Proteine nur einen geringeren Anteil der peroxisomalen Matrixproteine aus. Einige Spezies, wie Kieselalgen, die Fruchtfliege *D. melanogaster* und der Nematode *C. elegans*, haben diesen Importweg sogar ganz verloren [91, 92, 93]. Das Importsignal von PTS2-Proteinen wird vom Rezeptor Pex7 gemeinsam mit einem Co-Rezeptor gebunden; zusammen bilden beide Rezeptoren eine Bindetasche für das PTS2 des Cargo-Proteins aus [134]. Nur im trimeren Rezeptor-Co-Rezeptor-Cargo-Komplex ist die Bindung stark genug, um das PTS2-Protein im Weiteren in die peroxisomale Matrix zu importieren [89, 134, 145].

2.1.1 Die Deletion von *pex7* verhindert den peroxisomalen Import von PTS2-Proteinen

Zunächst wurde untersucht, ob der peroxisomale PTS2-Importweg in *U. maydis* funktionell ist und ob das Gen *um03596*, das für ein Homolog den konservierten PTS2-Rezeptors Pex7 kodiert, dafür benötigt wird. Um zu überprüfen, ob in Wildtyp (WT)-Zellen von *U. maydis* PTS2-Proteine ins Peroxisom importiert werden und um diesen Import fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen, wurde zunächst ein Fusionsprotein aus PTS2 und einem fluoreszierenden Protein in den Zellen exprimiert.

Die Suche nach PTS2-Proteinen in der *U. maydis*-Datenbank [184, 185, 186, 187, 188, 189] (Pattern Search: <-x(1,40)-[RK]-[LVIQ]-x(2)-[LVIHQ]-[LSGAK]-x-[QH]-[LAF]) ergab unter anderen das Protein Pot1 (Um01090). Die ersten 23 Aminosäuren des N-Terminus dieses Proteins (MAQRITQL-ASHLDPRSWGKGLH) wurden an das Fluorophor GFP fusioniert und die intrazelluläre Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 5).

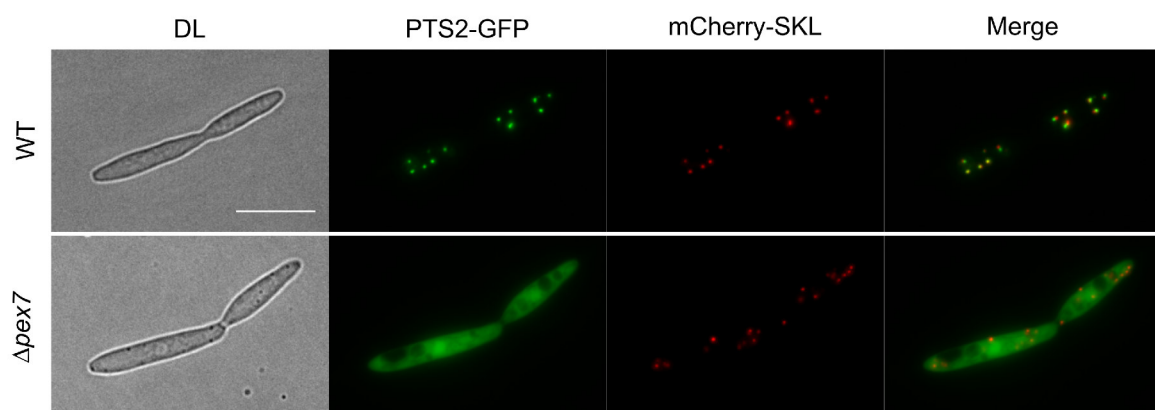


Abbildung 5: Der peroxisomale Import von PTS2-Proteinen hängt von Pex7 ab.

In WT-Zellen co-lokalisieren die peroxisomalen Matrixproteine mCherry-SKL (PTS1) und PTS2-GFP, während in einer Deletionsmutante für *pex7* das PTS2-Protein im Zytosol verbleibt. Gezeigt sind Maximum-Projektionen von einem 0,6 µm dicken Querschnitt der Zellen. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Im WT-Stamm Bub8 zeigte das Fusionsprotein PTS2-GFP eine punktförmige Lokalisierung innerhalb der Zelle (Abbildung 5). Diese Punkte co-lokalisierten mit dem peroxisomalen Markerprotein mCherry-SKL [130] (Abbildung 5). Um im Weiteren zu untersuchen, ob das Pex7-Homolog Um03596 an der Translokation von PTS2-GFP ins Peroxisom beteiligt ist, wurde das zugehörige Gen deletiert und die Mutanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass PTS2-GFP in der Deletionsmutante im Zytosol verbleibt, während mCherry-SKL weiterhin eine peroxisomale Lokalisierung aufwies (Abbildung 5). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in *U. maydis* PTS2-Proteine über den konservierten Rezeptor Pex7 ins Peroxisom transportiert werden.

2.1.2 Pex5b fungiert als Co-Rezeptor im PTS2-Import

Im Genom von *U. maydis* finden sich keine aus anderen Organismen bekannten PTS2-Co-Rezeptoren wie Pex20, Pex21 oder Pex18. Allerdings weist der PTS1-Rezeptor Pex5b von *U. maydis* Sequenzähnlichkeit mit diesen Peroxinen auf [69, 138]. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob in *U. maydis* der PTS1-Rezeptor Pex5b als Co-Rezeptor im PTS2-Importweg fungiert. Hierfür wurde die intrazelluläre Lokalisierung des PTS2-Markers in *pex5a*- und *pex5b*-Deletionsstämmen überprüft (Abbildung 6).

Während eine Deletion von *pex5a* keinen Einfluss auf den PTS2-Proteinimport hatte, verblieb der Marker PTS2-GFP in einer *pex5b*-Deletionsmutante im Zytosol (Abbildung 6). Da die mögliche Pex7-Bindedomäne (P7-BD) in der NTD von Pex5b liegt, wurde vermutet, dass eine Expression eben dieser NTD in einer *pex5b*-Deletionsmutante den PTS2-Importweg wieder aktivieren könnte. Tatsächlich konnte durch das Einbringen eines C-terminal verkürzten Pex5b-Proteins (HA-Tag und Aminosäuren 2-544 von Pex5b), welches die P7-BD aufweist, erneut peroxisomale Lokalisierung des PTS2-Markers beobachtet werden (Abbildung 6).

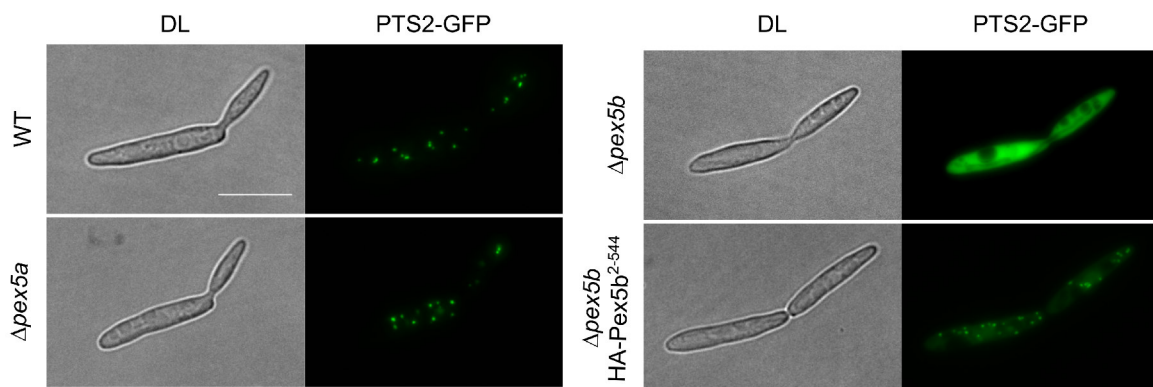


Abbildung 6: Peroxisomale Lokalisierung von PTS2-GFP hängt von Pex5b ab.

In WT-Zellen und in *pex5a*-Deletionsmutanten lokalisiert das Protein PTS2-GFP im Peroxisom. Eine Deletion des PTS1-Rezeptors *pex5b*, welcher eine Pex7-Bindedomäne aufweist [69], bringt den PTS2-Import zum Erliegen. In diesem Deletionsstamm wird durch Expression des verkürzten Pex5b-Proteins HA-Pex5b²⁻⁵⁴⁴ die peroxisomale Lokalisierung von PTS2-GFP wiederhergestellt. Gezeigt sind Maximum-Projektionen von einem 1,0 µm dicken Querschnitt durch die Zellen. Größenstandard: 10 µm.

2.1.3 Nur ein geringer Anteil der peroxisomalen Matrixproteine weist ein PTS2 auf

Um herauszufinden, wie viele Proteine in *U. maydis* ein peroxisomales Targeting-Signal am N-Terminus enthalten, wurde in der *U. maydis*-Datenbank [184, 185, 186, 187, 188, 189] nach Proteinen mit PTS2 gesucht (Pattern Search: <-x(1,40)-[RK]-[LVIQ]-x(5)-[QH]-[LAF]). Insgesamt weisen 122 Proteine die Konsensussequenz R/K-L/V/I/Q-X5-Q/H-L/A/F nahe am N-Terminus auf. Im Weiteren wurden die resultierenden Proteine mittels NCBI BLASTP [190] darauf untersucht, ob sie mögliche peroxisomale Matrixproteine sind. Dabei wurden solche Proteine eliminiert, die DNA oder RNA binden, am Zellzyklus beteiligt sind oder Enzyme, die in Stoffwechselwegen involviert sind, die nach heutigem Kenntnisstand nicht im Peroxisom ablaufen. Anschließend wurde die Literatur durchsucht und weiter gefiltert. Zusätzlich wurden Proteine aussortiert, die in der Konsensussequenz an den Positionen X2 negativ und an X3 geladene Aminosäuren oder ein Prolin innerhalb des möglichen PTS2-Motivs aufweisen, da diese Reste die Interaktion des peroxisomalen Targeting-Signals mit den Importrezeptoren verhindern [144]. Von den verbleibenden 28 Proteinen (Tabelle 3, Anhang) weisen einige, zusätzlich zum PTS2, weitere Zielsteuerungssequenzen auf.

Im Gegensatz dazu finden sich im Genom von *U. maydis* deutlich mehr Proteine, die ein mögliches PTS1 aufweisen. *U. maydis* erkennt teilweise andere PTS1-Proteine als *S. cerevisiae* [130], weshalb zur Suche nach möglichen PTS1-Proteinen die zur übrigen Literatur abweichende Konsensussequenz verwendet wurde: S/P/E/T/A/V/Q/P/G/N-K/R/M/V/S/L/K/N-L/M/F. Eine Suche nach möglichen PTS1-Proteinen in der oben genannten Datenbank (Pattern Search: [SPETAVQPGN]-[KRMVSLKN]-[LMF]->) resultierte in 375 Proteinen. Zwar ist dieses Ergebnis ungefiltert - nicht alle Proteine mit PTS1 sind auch peroxisomale Matrixproteine -, es zeigt aber, dass es auch in *U. maydis* deutlich mehr Proteine gibt, die ein PTS1 als ein PTS2 tragen.

2.2 Peroxisomale Importrezeptoren in *U. maydis* weisen konservierte Aminosäuren, Motive und Domänen auf

2.2.1 Aufbau des Importrezeptors Pex7

Pex7-Proteine binden PTS2-Proteine über ihre WD40-Domäne, die aus einer WD40-Repeat-ähnlichen Subdomäne und sechs WD40-Repeats besteht [134]. Um *U. maydis* Pex7 zu charakterisieren, wurde das Tool WDSPdb [135, 191, 192] zur Vorhersage der Proteinstruktur genutzt. Dieses Tool erkannte sieben WD40-Repeats in Um03596 (Abbildung 31, Anhang), was der konservierten Struktur von Pex7 entspricht. Auch der innerhalb der Pex7-Proteine konservierte „bulge loop“ ([N/H]-[F/Y]-G-[L/I]-[V/L/I/S/A]-G), der in *S. cerevisiae* die Interaktion zwischen Pex7p und Pex21pC vermittelt [134], konnte nahe des N-Terminus von UmPex7 identifiziert werden (NYGLVG, Aminosäuren 38-43) (Abbildung 7).

Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Pex7-Proteinen aus Mensch und Bäckerhefe weist Pex7 von *U. maydis* ein di-aromatisches Pentapeptid (WSPFF, Aminosäuren 23-27) nahe am N-terminalen Ende auf. Die WxxxF/Y-Motive sind in Pex5-Proteinen und PTS2-Co-Rezeptoren konserviert und

vermitteln die Interaktion mit Pex14 und Pex13 in der peroxisomalen Membran [109, 110].

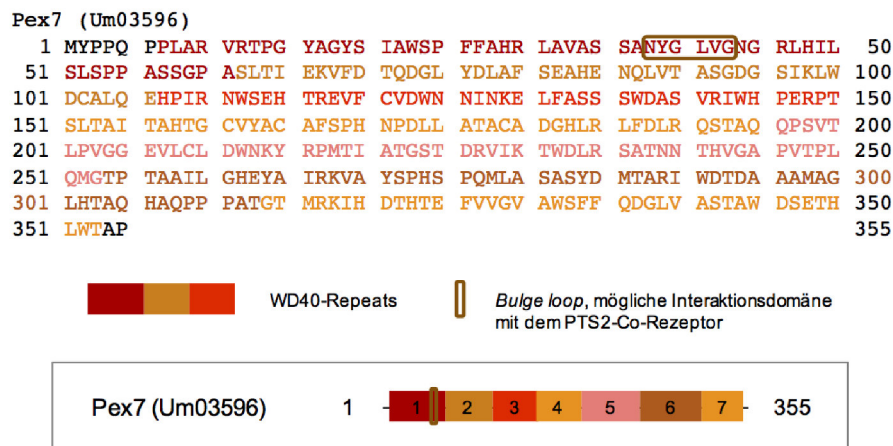


Abbildung 7: **Struktur von Pex7 in *U. maydis*.**

In der Aminosäuresequenz von Um03596 finden sich sieben WD40-Repeats (rot, orange, gelb), die sich zu einer siebenblättrigen Propellerstruktur falten. *U. maydis* weist außerdem innerhalb des ersten WD40-Repeats einen konservierten *bulge loop* auf, der in *S. cerevisiae* mit dem PTS2-Co-Rezeptor Pex21p interagiert.

2.2.2 Aufbau der Importrezeptoren Pex5a und Pex5b

Der Import von PTS1-Proteinen ins Peroxisom mittels des Rezeptors Pex5 besteht aus mehreren Schritten. Zuerst muss das PTS1-Protein gebunden werden, im Folgenden dockt der Pex5-Cargo-Komplex an die peroxisomale Membran an und das PTS1-Protein wird in die peroxisomale Matrix entlassen. Abschließend wird der PTS1-Rezeptor entweder recycelt oder degradiert.

Der erste Schritt, die Bindung des PTS1-Proteins an den Importrezeptor, erfolgt über die TPR-Domäne von Pex5 [107]. Die TPR-Domäne besteht aus sieben TPRs, die eine Bindetasche für PTS1 ausformen [108]. Für beide Pex5-Proteine in *U. maydis* ließen sich mittels des Tools TPRpred [193, 194] TPRs ermitteln. Dieses Tool sagt für Pex5a sechs (Tabelle 4, Anhang) und für Pex5b sieben (Tabelle 5, Anhang) TPRs voraus. Unter Berücksichtigung der TPR-Konsensussequenz $W_4-L_7-G_8-Y_{11}-A_{20}-F_{24}-A_{27}$ [195] und mittels Sequenzvergleich zu bekannten Pex5 TPR-Domänen ist es wahrscheinlich, dass die Aminosäuren 420 bis 454 von Pex5a die TPR1 formen (Abbildung 8). Das Pex5-Protein des Menschen folgt der TPR7 ein sogenannter „7C-Loop“, welcher ein C-terminales helikales Bündel mit dem Rest des Proteins verbindet [114]. Auch Pex5a und Pex5b weisen nach der TPR7 weitere Aminosäuren auf.

Im weiteren Verlauf des Imports peroxisomaler Proteine muss der PTS1-Rezeptor mit der peroxisomalen Membran interagieren. Dies erfolgt über eine Bindung an Pex14 oder Pex13 [109, 110]. Die Pex5-Pex14-Interaktion wird dabei über $W_{xxx}F/Y$ -Motive [111] oder ein $LV_{x}EF$ -Motiv vermittelt [196]. Beide Pex5-Proteine in *U. maydis* weisen kein $LV_{x}EF$ -Motiv auf, besitzen aber jeweils zwei $W_{xxx}F/Y$ -Motive (Abbildung 8).

Pex5a (Um02528)

1	MAFQS	MLNGA	ECSTS	NNGLA	QMLKH	TQQDR	SIQQG	DRTFT	GQPQT	GSTGM	50
51	RQQHQ	AGLNS	DADAF	FRQQQ	AASMP	RGAAS	SAFDL	QAMRN	ELNSA	VPSFQ	100
101	HPNAG	AAWAS	QMPRN	ATPSN	ADMEA	AFARR	GAPAR	SMQPP	AGSSA	WAQQF	150
151	GSSQH	QQPAA	MHQRP	VGSGS	GSGSG	SDPSA	AYASR	PIMGS	YGGMG	MGMGM	200
201	GGMGM	SMGMM	GGMGS	MQQQR	QYQPQ	QTQSS	QSRFT	ELDDA	TWEEQ	FKKLD	250
251	AEQSE	AESKG	KGKAK	ESEAD	LLPSE	AEQAE	SIRRE	LDAIE	QELTA	DGQEA	300
301	NSRFE	DLWRS	MNARN	GIPPS	SADAE	LAKWE	EELMK	SRADD	DGEQF	GYTHP	350
351	SGGLG	GGQHG	LDEMA	ALDGT	EDALL	DGFGV	VGPDG	YPRLG	QYRRS	QQNPF	400
401	ETHPD	PLSEG	LRLLA	NGGNL	SDAAL	LFEAA	TQRDT	QGGTG	GEVER	GEVDR	450
451	SRRER	SEAWR	RLGEC	QAMNE	KEAQA	IRALE	EAIKI	DENNL	EAYMS	LAIYS	500
501	TNEGY	DTAAH	QTLER	YISRA	YPNIK	AAPLS	AEISG	SKDPI	EGTEG	NPWAS	550
551	LNQVT	DLFLQ	AARQG	NSAGQ	IDPEV	QVGLG	VLFTY	QSAYE	QAQDC	FNSAL	600
601	SVRPN	DFLLW	NRLGA	TLANG	GKPEE	ATAAY	HKALE	LRPTF	TRAIY	NLSVS	650
651	CLNLG	AHHEA	AEHLL	AALSL	QQTHT	LPDVP	EGEQP	APTPL	AEAGE	SHNLW	700
701	STLRR	IFLVM	DRLDL	AQKAH	VGSSL	EQFRG	EGFDF				735

Pex5b (Um10172)

1	MSDLV	SGGAG	CGPSN	PLQNI	GKRFG	QDRGA	QQDTF	ASSPF	AQQQS	PSFRS	50
51	HNAAA	SSSQQ	QQPAF	FNAPS	QQVPL	ASQGN	LHDAF	DVSQI	RSNLP	SGSRM	100
101	PMQSQ	HHRST	PGPSM	ADLEA	SFRPA	FSRSS	TIQAA	PRAAV	QSGWA	SDFLS	150
151	AEASQ	SSVQA	QPAQQ	MHVDR	HSSHA	IHPNV	IPMGM	HMGMM	SMPHT	APNRH	200
201	FSPSH	LQEQH	QIHAI	AAPQL	DNARW	AEAFI	AFEVS	SKPAP	EAPAA	TADVQ	250
251	PSEKV	DYADP	QERDE	LARTA	GRLVS	SVEHD	QSSKF	RQSNF	LDLMR	KIRDK	300
301	QAGIE	GDNIY	ENAGT	STTTL	DKGKA	RAHDL	SASST	TQQAQ	PQSQQ	EAYSW	350
351	ANQMA	VSGGL	SHLPP	SVQKS	LAKNN	VQQSD	LPQAL	RNEQQ	IQNQQ	ALNDM	400
401	WAEED	ARSEA	IEKQA	MRESA	RAFVG	DGGDV	TARMR	EDDAD	AQEFE	RYQRL	450
451	GANIP	HASTF	NRRWE	EDLNR	STNEM	EEDEA	LDFVG	RRWEG	TKGRG	YPGAQ	500
501	TAEWD	KLQSD	WDNFE	VTSAG	IRPVT	LPQRS	GATTS	MQPAP	VYRFL	SDNBY	550
551	IATR	HHAH	AGGLP	AGLES	VLEKE	AAVQQ	DPQNA	SAWYD	LGVKQ	QENER	600
601	EVQAI	AALRK	ALDLD	ANLRD	AWLAL	AVSYT	NENDR	TAAVE	AIERW	IESND	650
651	KYREV	VQRAK	AEVDA	ANLCK	QRGRS	DSVSS	HSTSA	SVVEK	HSRLT	SLLIA	700
701	MVRSG	GERGE	IDADV	QVALG	VIFNS	SEDYD	KAVDC	FSTAL	SVRPQ	DWLLY	750
751	NRLGA	TLNSN	GRSAE	AIQYY	HHALN	LQPEF	VRCHF	NLSIS	CLNLK	MYQDA	800
801	AEHIY	TALTL	QQAEA	ETLGM	AAEKD	SATSG	SLWET	FRVAL	ELLNR	SDLAA	850
851	KCSRR	DINAF	DLSDF	VAPAS	GSGSA	GGVGE	VPFDY				885

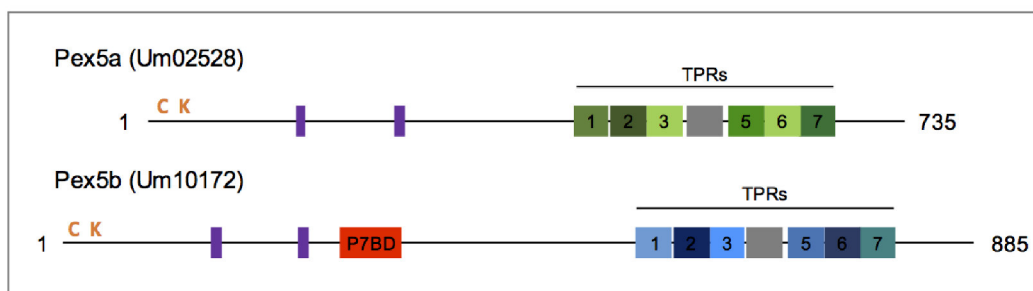
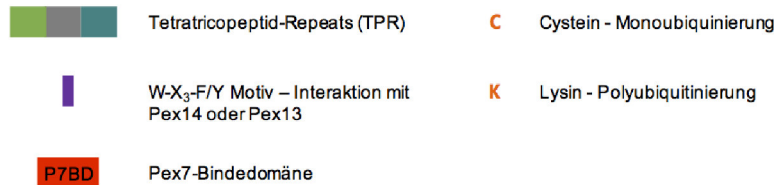


Abbildung 8: Struktur von Pex5a und Pex5b von *U. maydis*.

Die C-terminale Domäne sowohl von Pex5a als auch von Pex5b weisen sieben Tetratricopeptid-Repeats (grün, blau) auf, die eine Bindetasche für das PTS1-Motiv formen. Von den für die Interaktion mit der peroxisomalen Membran benötigten W_{xxx}F/Y-Motiven finden sich in beiden PTS1-Rezeptoren jeweils zwei (violett). Auch die für Mono- und Polyubiquitinierung benötigten Cysteine und Lysine (orange) weisen sowohl Pex5a als auch Pex5b nahe ihrer N-terminalen Enden auf. Pex5b fungiert außerdem als PTS2-Co-Rezeptor und enthält eine Pex7-Bindedomäne (rot).

Nach der Translokation des PTS1-Proteins ins Peroxisom wird der Pex5-Rezeptor entweder recycelt (zuvor mono-ubiquitiniert) oder über das Proteasom degradiert (zuvor poly-ubiquitiniert). Die Mono-Ubiquitinierung findet an einem konservierten Cystein am N-terminalen Ende von Pex5 statt [115, 116, 117]. Poly-ubiquitiniert wird ein konserviertes Lysin [70, 116, 120, 124], welches ebenso wie das Cystein im N-terminalen Bereich von Pex5a und Pex5b vorhanden ist (Abbildung 8).

Im Abschnitt 2.1.2 der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pex5b für die peroxisomale Lokalisierung des PTS2-Markers PTS2-GFP notwendig ist. Es ist bekannt, dass sowohl Co-Rezeptoren wie Pex18, Pex21 oder Pex20 als auch jene Pex5-Proteine, die für den PTS2-Import essentiell sind, eine P7-BD aufweisen [68]. Ein Sequenzvergleich von Pex5a und Pex5b mit anderen PTS2-Co-Rezeptoren zeigt, dass auch Pex5b Sequenzhomologie zu der P7-BD aufweist (Abbildung 8) [69, 138].

2.3 Für das Wachstum auf Ölsäure ist der Import peroxisomaler Matrixproteine essentiell

In *U. maydis* findet der Abbau von Fettsäuren sowohl in Mitochondrien als auch in Peroxisomen statt, wobei die peroxisomale β -Oxidation für die Verstoffwechselung von ungesättigten und langkettigen Fettsäuren essentiell ist [163, 170, 171]. Unter Fettsäurebedingungen, bei denen die peroxisomale β -Oxidation essentiell ist, führen Störungen im Import von Matrixproteinen oder der Biogenese der Peroxisomen zu einem stark eingeschränkten Wachstum der betroffenen Zellen [130, 163, 171]. Interessanterweise ist das Wachstum in diesen Mutanten auch in Gegenwart einer anderen Kohlenstoffquelle, wie z. B. Glukose, gestört [130]. Die Ursache dieser Toxizität liegt wahrscheinlich in einem gestörtem Gleichgewicht zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in Zellmembranen, wodurch die biophysikalischen Eigenschaften der Membranen geändert werden [197].

2.3.1 Für das Wachstum auf Ölsäure ist nicht der PTS2- jedoch der PTS1-Proteinimport essentiell

Um zu überprüfen, ob die PTS1- oder PTS2-Rezeptoren für die peroxisomale β -Oxidation notwendig sind, wurden Deletionsmutanten für diese Importrezeptoren unter Ölsäurebedingungen auf ihr Wachstum untersucht. Die Deletionsmutanten für die PTS1-Rezeptoren ($\Delta pex5a$, $\Delta pex5b$) und den PTS2-Rezeptor ($\Delta pex7$) wurden auf mit Glukose (1 %) oder Ölsäure (0,2 %) supplementierte YNB-Agarplatten getropft. Als Kontrollen dienten WT-Zellen und peroxisom-lose Mutanten ($\Delta pex3$, $\Delta pex19$) (Abbildung 9). Pex3 und Pex19 sind an der peroxisomalen Biogenese beteiligt und deren Deletion führt zum Verlust von Peroxisomen, Mislokalisierung peroxisomaler Matrixproteine ins Zytosol und starker Reduzierung assoziierter enzymatischer Aktivitäten [198]. Ölsäure ist mit 18 C-Atomen und einer Doppelbindung eine langkettige, ungesättigte Fettsäure (C18:1) und kann nur im Peroxisom verstoffwechselt werden.

Funktionelle Peroxisomen sind für die β -Oxidation von Fettsäuren essentiell und das Fehlen dieser durch Deletion wichtiger Biogenesefaktoren wie *pex19* oder *pex3* führte auch in *U. maydis* zum Ver-

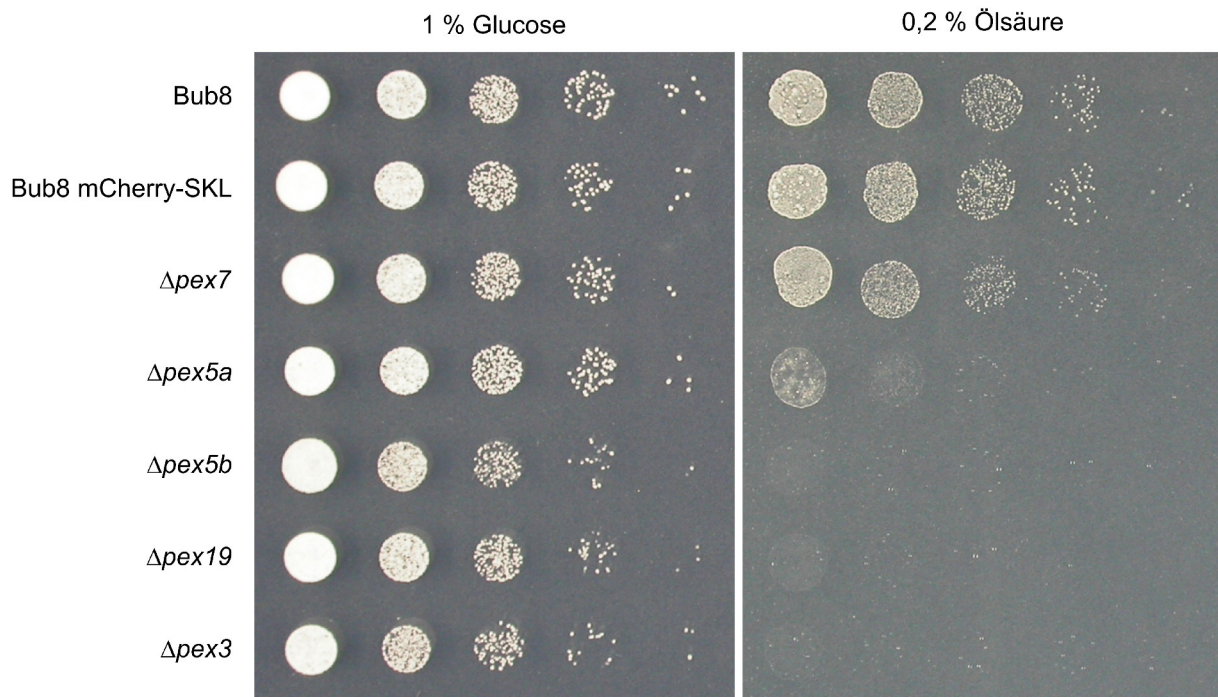


Abbildung 9: Funktionelle Peroxisomen sind essentiell für das Wachstum auf Ölsäurehaltigem Agar.

Auf mit Glukose oder Ölsäure als Kohlenstoffquelle versetzten YNB-Agarplatten wurden verschiedene Stämme in zehnfachen Verdünnungsstufen, ausgehend von $OD_{600} = 1$, zu je 5 μ l getropft. Nach 48 h Inkubation bei 23 °C wurden die Platten fotografiert. Der gezeigte Stamm Bub8 mCherry-SKL war der Ausgangsstamm für die folgenden Deletionsmutanten. Stämme ohne funktionelle Peroxisomen ($\Delta pex3$, $\Delta pex19$) oder ohne den PTS1-Rezeptor Pex5b zeigen keinerlei Wachstum auf mit Ölsäure supplementiertem Agar. Eine Deletion von *pex5a* führt zu einem reduzierten Wachstum unter dieser Bedingung, während eine Deletion des PTS2-Rezeptors keinerlei Einfluss auf das Wachstum hat.

lust der Fähigkeit, Ölsäure zu verstoffwechseln (Abbildung 9). Deletionsmutanten für *pex5b* zeigten denselben Phänotyp wie $\Delta pex3$ und $\Delta pex19$, was die Vermutung nahe legt, dass der PTS1-Rezeptor essentiell für das Funktionieren der Peroxisomen in *U. maydis* ist. Zellen ohne *pex5a* zeigten ebenfalls ein eingeschränktes Wachstum auf mit Ölsäure supplementiertem Agar, der Phänotyp war aber deutlich schwächer ausgeprägt als nach *pex5b*-Deletion. Unbeeinflusst von der Kohlenstoffquelle zeigte sich die Mutante mit einer Deletion des PTS2-Rezeptors Pex7 (Abbildung 9), was darauf hindeutet, dass der PTS1- aber nicht der PTS2-Import für die Verstoffwechselung von Ölsäure notwendig ist.

Wie bereits zuvor für $\Delta pex6$ und $\Delta pex3$ beobachtet [130, 163], zeigten auch die Deletionsmutanten für *pex5b* und *pex19* ein leicht reduziertes Wachstum auf Glukose-haltigem Agar (Abbildung 9). Die drei in Stämme, die unter Glukosebedingungen leicht reduziertes und unter Ölsäurebedingungen keinerlei Wachstum aufwiesen (Abbildung 9), haben gemein, dass sie keine peroxisomale Lokalisierung des PTS1-Markers mCherry-SKL [130] zeigen (Abbildung 10).

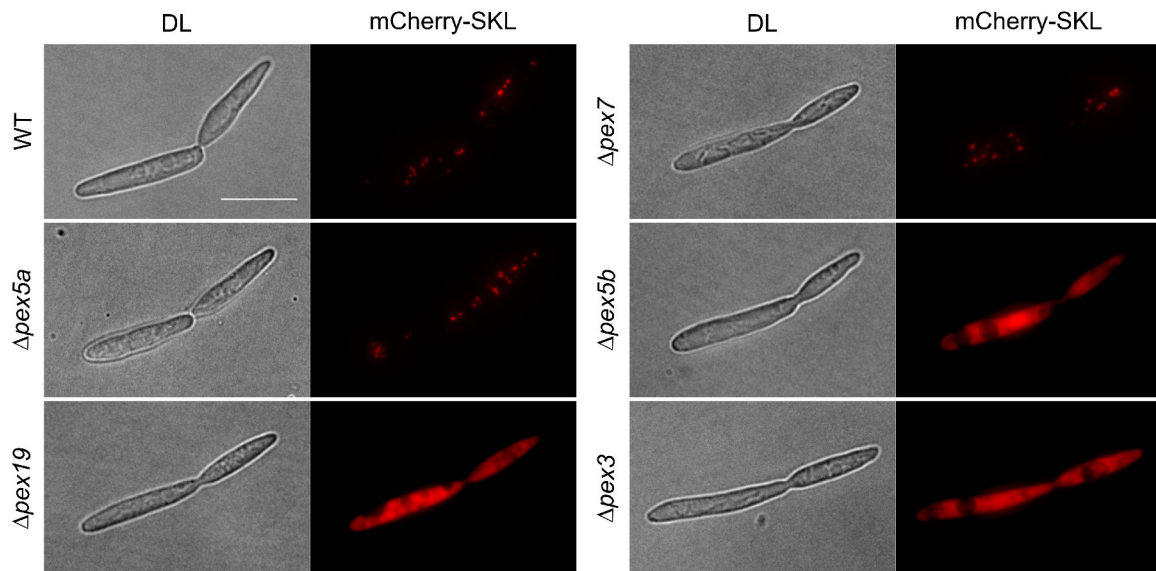


Abbildung 10: Intrazelluläre Lokalisierung vom peroxisomalen Marker mCherry-SKL in Deletionsmutanten verschiedener Peroxine.

Die Lokalisierung des peroxisomalen Matrixproteins mCherry-SKL bleibt unbeeinflusst von Deletionen von *pex7* und *pex5a*. Bei Deletion des PTS1-Rezeptors *pex5b* verbleibt mCherry-SKL im Zytosol, ebenso bei Deletion der für die Biogenese benötigten Peroxine *pex19* und *pex3*. Gezeigt sind Maximum-Projektionen. Größenstandard: 10 μ m.

2.3.2 Pex5a und Pex5b sind nicht austauschbar während des Wachstums auf Ölsäure-haltigem Agar

Es sollte untersucht werden, ob die beobachteten Wachstumsdefizite von $\Delta pex5a$ - und $\Delta pex5b$ -Stämmen auf Ölsäure-haltigem Agar dadurch zustande kommen, dass die Gesamtmenge an Pex5-Protein in einer Einzeldeletion geringer ist als im Wildtyp. Wenn die Proteine Pex5a und Pex5b untereinander austauschbar sind, sollte eine zusätzliche Expression von einem *pex5* den Deletionsphänotyp des anderen *pex5* komplementieren. Um die Expression im Wildtyp zu imitieren, wurden die *pex5*-Gene unter die Kontrolle des jeweils anderen *pex5*-Promoters gebracht. Mit den Konstrukten $P_{pex5a}:pex5b$ bzw. $P_{pex5b}:pex5a$ wurden der WT Bub8 und die Deletionsmutanten für *pex5a* bzw. *pex5b* transformiert. Die Konstrukte wurden durch homologe Rekombination in den *sdh2*-Lokus eingebracht. Anschließend wurde mittels Southern Blot nach Einzelintegrationen gesucht. Diese Mutanten wurden anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf Ölsäure-haltige YNB-Agar-Platten getropft (Abbildung 11).

Eine zusätzliche Expression von *pex5a* oder *pex5b* im WT hatte keinerlei Einfluss auf das Wachstum, unabhängig davon, ob Glukose oder Ölsäure als Kohlenstoffquelle zur Verfügung standen (Abbildung 11). Der Wachstumsdefekt einer *pex5a*-Deletion auf Ölsäure-haltigem Agar wurde durch die Expression von *pex5a* unter dem Promoter von *pex5b* komplementiert, wohingegen der Deletionsphänotyp nicht durch zusätzliche Expression von *pex5b* unter dem *pex5a*-Promoter komplementiert werden konnte (Abbildung 11). Genauso führte die Expression von *pex5b* unter dem *pex5a*-Promoter in einer *pex5b*-Deletion zu einem wildtypischen Wachstum, während die zusätzliche Expression von

pex5a in dieser Deletionsmutante zu keiner Änderung des Phänotyps führte (Abbildung 11).

Auch eine Überexpression von *pex5b* unter dem *etef*-Promoter konnte den Deletionsphänotyp von *pex5a* nicht komplementieren (Abbildung 33, Anhang).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass *pex5a*- bzw. *pex5b*-Deletionsmutanten durch Expression des zuvor deletierten Gens - auch unter dem anderen *pex5*-Promoter - komplementiert werden können. Nicht jedoch sind *pex5a* und *pex5b* unter den gewählten Bedingungen gegeneinander austauschbar.

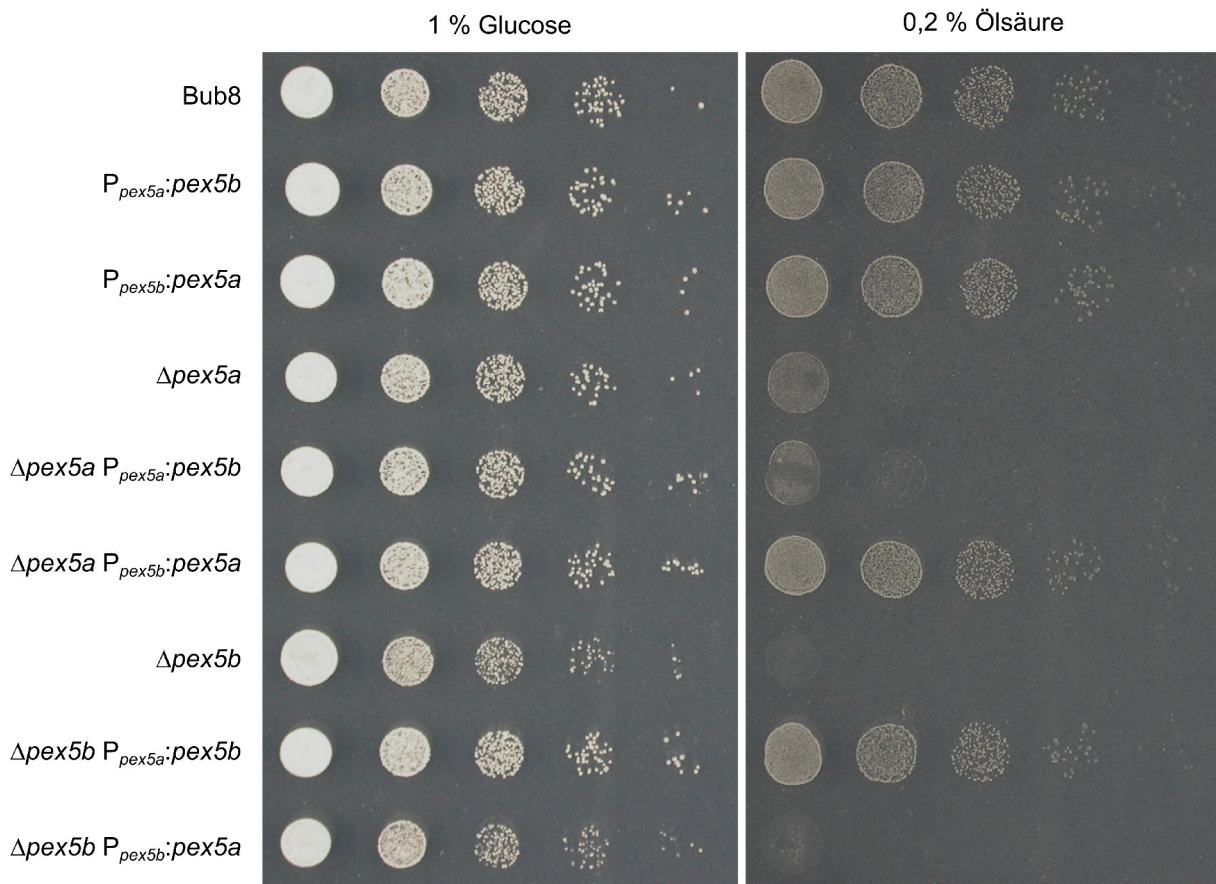


Abbildung 11: ***pex5a* und *pex5b* können einander nicht komplementieren.**

Expressiert wurden die Gene *pex5a* und *pex5b* unter dem jeweils anderen *pex5*-Promoter im Wildtyp und in den Einzeldelentionsmutanten. Die Stämme wurden auf YNB-Agar, supplementiert mit Glukose oder Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle, in 10-fachen Verdünnungsstufen, ausgehend von $OD_{600} = 1$, zu je 5 μ l getropft. Nach 48 h Inkubation bei 23 °C wurden die Platten fotografiert. Dabei zeigte sich, dass eine *pex5a*- bzw. *pex5b*-Deletion nur durch Expression des zuvor deletierten Gens komplementiert werden kann und nicht durch Expression des anderen *pex5*.

2.4 Die Funktion von Pex5a als PTS1-Rezeptor ist abhängig von Pex5b

2.4.1 Das peroxisomale Targeting der meisten PTS1-Proteine ist unbeeinflusst von einer *pex5a*-Deletion

Nachdem mCherry-SKL in einer *pex5b*-Deletionsmutante im Zytosol verblieb, obwohl *pex5a* vorhanden war (Abbildung 10), sollte die intrazelluläre Lokalisierung weiterer PTS1-Proteine in den Stämmen mit *pex5a*- bzw. *pex5b*-Deletion untersucht werden. Das PTS1 ist über die letzten zwölf Aminosäuren definiert [104] und deshalb wurden die letzten zwölf Aminosäuren eines möglichen peroxisomalen Matrixproteins an GFP fusioniert und die intrazelluläre Lokalisierung dieses Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch in beiden Mutanten bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der PTS1-Import in $\Delta pex5b$ -Stämmen aufgehoben zu sein scheint, da kein einziges getestetes GFP-PTS1-Protein im Peroxisom lokalisierte (Tabelle 1). Dagegen beeinflusste eine Deletion von *pex5a* den peroxisomalen Import der meisten Matrixproteine nicht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Intrazelluläre Lokalisierung verschiedener GFP-PTS1-Proteine

Die letzten zwölf Aminosäuren eines Proteines wurden an GFP fusioniert und die intrazelluläre Lokalisierung dieses GFP-PTS1-Proteins in Deletionsmutanten für *pex5a* und *pex5b* untersucht. Die möglichen PTS1 aus anderen Organismen wurden in ihrer Basenfolge an das Vorkommen der Codons in *U. maydis* angepasst um schlechte Expression dieser zu vermeiden. Wenn ein GFP-PTS1-Fusionsprotein weder in $\Delta pex5a$ noch in $\Delta pex5b$ peroxisomales Targeting zeigte, wurde es im WT exprimiert. Die hier gezeigten Proteine, die in beiden Einzeldelentionsmutanten im Zytosol verbleiben, lokalisierten im Wildtyp peroxisomal. Für die Vorhersage der peroxisomalen Lokalisation wurde der PTS1-Predictor verwendet [105, 106].

Gen	PTS1	Vorhersage	Lokalisation: $\Delta pex5a$	Lokalisation: $\Delta pex5b$
<i>um00589</i>	ELKNGGHVKANI*	6,269	peroxisomal	zytosolisch
<i>um01329 (idh1)</i>	THEFTQAVLSNL*	7,525	peroxisomal	zytosolisch
<i>um01438 (mac3)</i>	TIIVQCCHIASL*	-15,945	peroxisomal	zytosolisch
<i>um01540</i>	THTAELTRRANL*	11,316	peroxisomal	zytosolisch
<i>um03299 (tpi1)</i>	ANASLAGQSARI*	0,734	peroxisomal	zytosolisch
<i>um04744</i>	QACILRPHAHLN*	-0,909	peroxisomal	zytosolisch
<i>um05230 (shy1)</i>	NDQMNQWIQQNL*	-5,938	zytosolisch	zytosolisch
<i>um06153</i>	TLPQLSSPRANL*	10,758	peroxisomal	zytosolisch
<i>um06507</i>	PISVPVGLPSKL*	-10,131	peroxisomal	zytosolisch
<i>um10538</i>	KREDQNEAKANL*	6,524	peroxisomal	zytosolisch
<i>um10797</i>	SQIKQHSEPNL*	7,359	peroxisomal	zytosolisch
<i>um11161 (mdh1)</i>	NISKGVQFTANL*	5,083	peroxisomal	zytosolisch
<i>um11953</i>	AALEDGEPKANL*	8,615	peroxisomal	zytosolisch
<i>gapd (A.n.)</i>	ETGRKPMARSSL*	12,509	peroxisomal	zytosolisch
<i>gapd (B.c.)</i>	VELKPNAHPQKL*	0,584	peroxisomal	zytosolisch
<i>gapd (C.a.)</i>	VAKASASSKTRL*	1,469	peroxisomal	zytosolisch
<i>pgk1 (H.s.)</i>	KVLPGVDALSNI*	2,542	zytosolisch	zytosolisch
<i>pgk2 (H.s.)</i>	KILPGVEALSNM*	8,354	zytosolisch	zytosolisch
<i>gapd2 (P.b.)</i>	LLVHVAKVDGNL*	-35,342	zytosolisch	zytosolisch
<i>pgk (P.m.)</i>	VSALSKKSVSSSL*	3,796	peroxisomal	zytosolisch

gapd, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, *pgk*, Phosphoglyceratkinase, *A.n.*, *Aspergillus nidulans*, *B.c.*, *Botrytis cinerea*, *C.a.*, *Candida albicans*, *H.s.*, *Homo sapiens*, *P.b.*, *Phycomyces blakesleeana*, *P.m.*, *Penicillium marneffe*

2.4.2 Pex5a ist nur in Anwesenheit der N-terminalen Domäne von Pex5b funktionell

Die Untersuchung verschiedener GFP-PTS1 auf ihre intrazelluläre Lokalisierung ergab, dass PTS1-Proteine niemals in Peroxisomen lokalisieren, wenn *pex5b* deletiert ist (Tabelle 1). Außerdem konnten vier verschiedene GFP-PTS1-Proteine identifiziert werden, die in einer *pex5a*-Deletionsmutante im Zytosol lokalisierten, obwohl die entsprechenden Fusionsproteine im WT eine peroxisomale Lokalisierung aufwiesen (Tabelle 1). Diese Beobachtungen legen nahe, dass der PTS1-Import nur dann funktionell ist, wenn Pex5b vorhanden ist und dass der spezifische Pex5a-vermittelte Import ebenfalls von Pex5b abhängt.

Pex5-Proteine sind in zwei Domänen gegliedert: Die unstrukturierte NTD, über die die Interaktion mit anderen Peroxinen vermittelt wird, und die strukturierte C-terminale Domäne, die mittels der TPRs PTS1-Proteine bindet [196, 199, 200]. Bei einer Abhängigkeit von Pex5a von Pex5b ist es deshalb wahrscheinlich, dass die NTD von Pex5b eine zentrale Rolle für den Import spielt. Daher sollte Pex5a zusammen mit der NTD von Pex5b exprimiert und im Folgenden überprüft werden, ob Pex5a unter dieser Bedingung PTS1-Proteine ins Peroxisom importieren kann. Dafür sollte in einer $\Delta pex5b$ -Mutante die NTD von Pex5b (HA-Pex5b²⁻⁵⁴⁴) exprimiert und anschließend die intrazelluläre Lokalisierung von mCherry-SKL untersucht werden.

Im Voraus sollte sicher gestellt werden, dass Pex5 mit einem N-terminalen HA-Tag funktionell ist. Dafür wurden Deletionsstämme für *pex5a* und *pex5b* mit P_{etef} :HA₂-Pex5a bzw. P_{etef} :HA₂-Pex5b transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Southern Blot auf die Integration der Konstrukte in den *sdh2*-Lokus untersucht und anschließend wurde das Wachstum der Stämme mit Einfachintegrationen von HA₂-Pex5a bzw. HA₂-Pex5b auf Ölsäure-haltigem YNB-Agar überprüft (Abbildung 12). Dabei zeigte sich, dass sowohl Pex5a als auch Pex5b mit N-terminalem HA-Tag in der Lage sind, den jeweiligen Deletionsphänotyp von *pex5a* oder *pex5b* unter dieser Bedingung zu komplementieren (Abbildung 12).

Während mCherry-SKL in $\Delta pex5b$ -Stämmen im Zytosol verblieb (Abbildung 10), lokalisierte es bei zusätzlicher Expression von HA-Pex5b²⁻⁵⁴⁴ wieder peroxisomal (Abbildung 13). Als weiterer Ansatz wurde endogen die C-terminale Domäne von *pex5b* deletiert (*pex5b* Δ TPR). Um auszuschließen, dass die NTD von Pex5b allein in der Lage ist, peroxisomale Matrixproteine zu importieren, wurde zusätzlich *pex5a* deletiert ($\Delta pex5a$ *pex5b* Δ TPR). Beide Stämme wurden auf die Lokalisierung des PTS1-Proteins mCherry-SKL untersucht. Dabei zeigte sich, dass mCherry-SKL nur dann im Peroxisom lokalisierte, wenn sowohl Pex5a als auch die NTD von Pex5b vorhanden waren (Abbildung 13). In der Mutante ohne *pex5a* und ohne die TPRs von Pex5b verbleibt das peroxisomale Fluoreszenzprotein im Zytosol (Abbildung 13). Diese Ergebnisse zeigen, dass Pex5a nur in Anwesenheit der NTD von Pex5b als PTS1-Rezeptor funktionell ist.

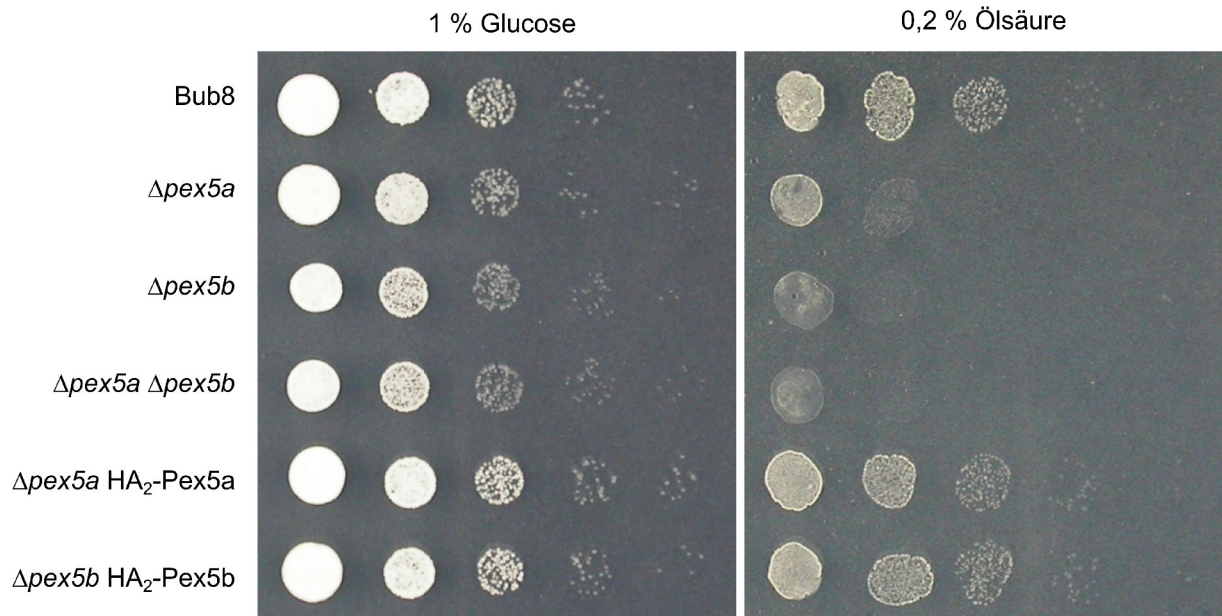


Abbildung 12: **HA-getaggte Varianten von Pex5 komplementieren den Deletionsphänotyp.** Deletionen von *pex5a* und *pex5b* führen zu einem verminderten bis zu fehlendem Wachstum auf Ölsäurehaltigem YNB-Agar. HA₂-Pex5a bzw. HA₂-Pex5b komplementieren den jeweiligen Deletionsphänotyp; die Stämme wachsen wie der WT, wenn Ölsäure als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Die *U. maydis*-Stämme wurden ausgehend von OD₆₀₀ = 1 in 10-fachen Verdünnungsstufen zu jeweils 3 µl auf YNB-Agar, supplementiert mit Glukose oder Ölsäure als C-Quelle, getropft und für 48 h bei 23 °C inkubiert.

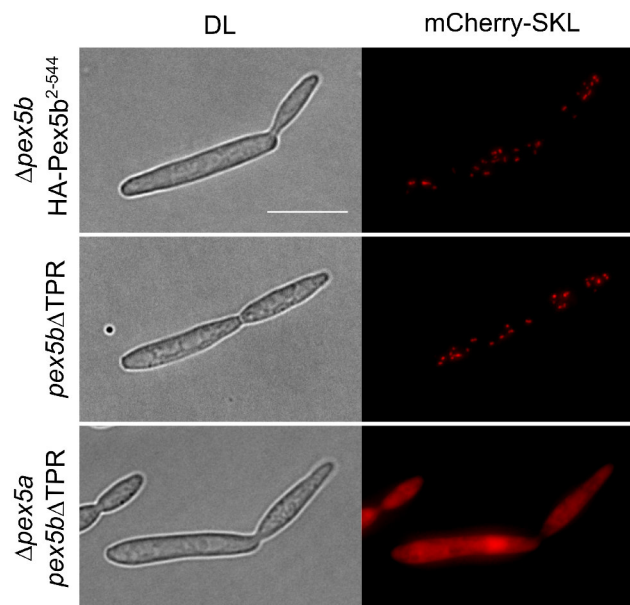


Abbildung 13: **Pex5a kann in Anwesenheit der NTD von Pex5b mCherry-SKL importieren.** Das peroxisomale Matrixprotein mCherry-SKL wird in die Peroxisomen transloziert, wenn sowohl *pex5a* als auch die NTD von Pex5b in den Zellen exprimiert werden. Sind sowohl *pex5a* als auch die TPR-Domäne von Pex5b deletiert, verbleibt mCherry-SKL im Zytosol. Gezeigt sind Maximum-Projektionen. Größenstandard: 10 µm.

2.5 Sowohl Pex5a als auch Pex5b sind in der Bäckerhefe funktionell

Wie zuvor beschrieben, ist in *U. maydis* das Protein Pex5b allein in der Lage ist, peroxisomale Matrixproteine vom Zytosol ins Peroxisom zu importieren, während Pex5a nur in Abhängigkeit von der NTD von Pex5b als Importrezeptor fungiert. Deshalb sollten beide Importrezeptoren von *U. maydis* heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert werden, um mehr über die Funktionen von Pex5a und Pex5b zu lernen.

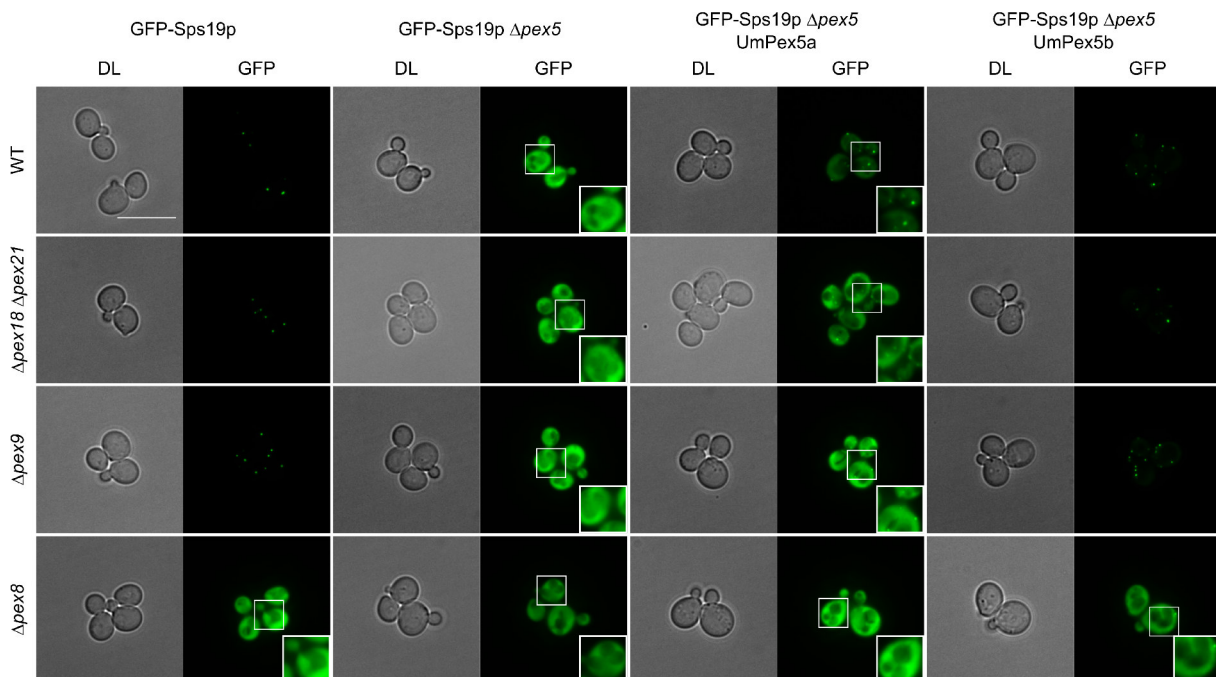


Abbildung 14: Pex5a und Pex5b von *U. maydis* sind funktionelle PTS1-Rezeptoren in *S. cerevisiae*.

Sps19p ist ein peroxisomales Matrixprotein, welches über sein PTS1-Motiv von Pex5p gebunden und anschließend in die Peroxisomen transloziert wird. Eine Deletion von *pex5* in Hefe führt dazu, dass GFP-Sps19p im Zytosol verbleibt. Durch Expression von *U. maydis* Pex5a bzw. Pex5b lokalisiert das PTS1-Markerprotein wieder in den Peroxisomen. *UmPex5a* und *UmPex5b* sind in Bäckerhefe funktionell, unabhängig davon, ob die *S. cerevisiae* Peroxingene *pex18*, *pex21* oder *pex9* deletiert sind. Der Verlust des Peroxins Pex8 führt jedoch zum Verlust des peroxisomalen Targetings von GFP-Sps19p auch in Anwesenheit von *UmPex5a* oder *UmPex5b*. Gezeigt sind Maximum-Projektionen. Größenstandard: 10 µm.

Es sollte zuerst überprüft werden, ob *UmPex5a* und *UmPex5b* in *S. cerevisiae* ein peroxisomales Matrixprotein vom Zytosol ins Peroxisom translozieren können. Dafür wurde zunächst in *S. cerevisiae* das peroxisomale Protein GFP-Sps19p konstitutiv exprimiert und anschließend das hefe-eigene *pex5*-Gen deletiert. Sps19p ist ein peroxisomales Matrixprotein und weist ein PTS1 auf [201]. Im WT zeigt GFP-Sps19p eine punktförmige Lokalisierung (Abbildung 14) und co-lokalisiert mit anderen peroxisomalen Matrixproteinen [130]. Bei Deletion von *pex5* verblieb das Fluoreszenzprotein im Zytosol (Abbildung 14). Anschließend wurden die Pex5-Proteine von *U. maydis* in diesem Deletionsstamm exprimiert. Dies führte zu einer peroxisomalen Re-Lokalisierung von GFP-Sps19p (Abbildung 14); sowohl Pex5b als auch Pex5a - hier unabhängig von Pex5b - fungieren als funktionelle PTS1-Rezeptoren

in *S. cerevisiae*.

Das Genom von *U. maydis* kodiert nicht für PTS2-Co-Rezeptoren wie Pex18p, Pex21p oder Pex20p, sondern die für diese Funktion benötigte P7-BD findet sich in der NTD von UmPex5b [69, 138]. Da gezeigt werden konnte, dass Pex5a ebenfalls die NTD von Pex5b für die Funktion als Importrezeptor benötigt (Abschnitt 2.4.2) und die NTD von Pex5b Homologie zu PTS2-Co-Rezeptoren zeigt [69, 138], stellte sich die Frage, ob UmPex5a in Bäckerhefe nur funktionell ist, weil das Genom dieses Ascomyceten sowohl für Pex18p als auch für Pex21p kodiert. Um dies zu überprüfen, sollte die intrazelluläre Lokalisierung von GFP-Sps19p in Anwesenheit von UmPex5a und nach Deletion von *pex18* und *pex21* beobachtet werden. GFP-Sps19p lokalisierte in diesen Stämmen weiterhin peroxisomal (Abbildung 14). Folglich ist UmPex5a in Bäckerhefe unabhängig von Pex18 und Pex21 funktionell. Dies trifft auch auf Pex5b zu, denn auch nach Expression von UmPex5b lokalisierte GFP-Sps19p in Deletionsmutanten von *pex18* und *pex21* weiterhin peroxisomal (Abbildung 14).

Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert ebenfalls für ein zweites, Pex5-ähnliches Protein [202]. Das inzwischen Pex9 benannte Protein fungiert unter Ölsäurebedingungen als Glyoxylat-spezifischer PTS1-Rezeptor, agiert aber unabhängig vom zweiten Pex5 in der Bäckerhefe [128, 129]. Um festzustellen, ob UmPex5a in *S. cerevisiae* deshalb ohne UmPex5b funktionell ist, weil ein zweites, hefeeigenes Pex5 vorliegt, wurden auch $\Delta pex9$ -Stämme auf die intrazelluläre Lokalisierung von GFP-Sps19p untersucht. Wenn ScPex5 vorhanden war, führte eine Deletion von *pex9* in Hefe nicht zum Verlust des peroxisomalen Targetings von GFP-Sps19p (Abbildung 14). Interessanterweise sind UmPex5a und UmPex5b in einem *S. cerevisiae*-Stamm mit Deletionen für *pex5* und *pex9* immer noch funktionell, da das peroxisomale Matrixprotein GFP-Sps19p in den Peroxisomen re-lokalisierte (Abbildung 14).

Ein weiteres Peroxin, welches in Hefen nachweislich am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligt ist, ist Pex8 [203]. Pex8p bindet sowohl an den Docking- als auch an den RING-Komplex und bringt so die Membranperoxin-Komplexe für die Pex5p-Interaktion sowie für die Translokation des peroxisomalen Matrixproteins in räumliche Nähe [38]. Andererseits wird auch eine direkte Bindung von Pex8p an Pex5p diskutiert [204, 205]. Möglicherweise sorgt diese Interaktion für eine Konformationsänderung des Importrezeptors, wodurch die Freisetzung des Cargos ausgelöst wird [206]. Anders als die Deletionsstämme für *pex18* *pex21* und *pex9* zeigt GFP-Sps19p in einer *pex8*-Deletionsmutante eine zytosolische Lokalisation, an welcher sich auch mit Expression von UmPex5a oder UmPex5b nichts ändert. (Abbildung 14). Von den Hefezellen, die UmPex5b in diesem Hintergrund exprimierten, wiesen einzelne singuläre Punkte auf, die möglicherweise Peroxisomen sein könnten; doch im Vergleich zu den anderen Deletionsstämmen, die UmPex5b exprimierten, lässt sich schlussfolgern, dass der Import drastisch ineffektiver stattfindet, wenn *pex8* deletiert ist.

Zusammenfassend ließ sich beobachten, dass UmPex5a und UmPex5b in der Bäckerhefe funktionelle PTS1-Rezeptoren sind, die weder von Pex18p noch Pex21p noch Pex9p abhängig sind, wobei UmPex5b in der Bäckerhefe effizienter als UmPex5a importierte. Beide PTS1-Rezeptoren von *U. maydis* sind in *S. cerevisiae* aber nur in Anwesenheit von Pex8p in der Lage, GFP-Sps19p ins Peroxisom zu translozieren (Abbildung 14).

2.6 Pex5a und Pex5b weisen unterschiedliche Cargospezifitäten auf

2.6.1 Einige PTS1-Proteine werden vorwiegend oder ausschließlich von Pex5a erkannt

In Abschnitt [2.4.1](#) wurde beschrieben, dass GFP-PTS1-Proteine nie im Peroxisom lokalisierten, wenn *pex5b* deletiert war, aber eine Deletion von *pex5a* meist keinen Einfluss auf das peroxisomale Targeting dieser Fusionsproteine hatte. Ausnahme bildeten nur vier PTS1-Motive von Proteinen, von denen drei nicht aus *U. maydis* stammten. Es handelte sich um Fusionsproteine aus GFP und den letzten zwölf Aminosäuren der Phosphoglyceratkinasen (Pgk) 1 und 2 aus *Homo sapiens*, der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Gapdh) 2 des ursprünglichen Pilzes *Phycomyces blakesleeanus* und des Proteins Salicylathydroxylase (Shy) 1 aus *U. maydis*. Diese vier GFP-PTS1-Proteine lokalisierten

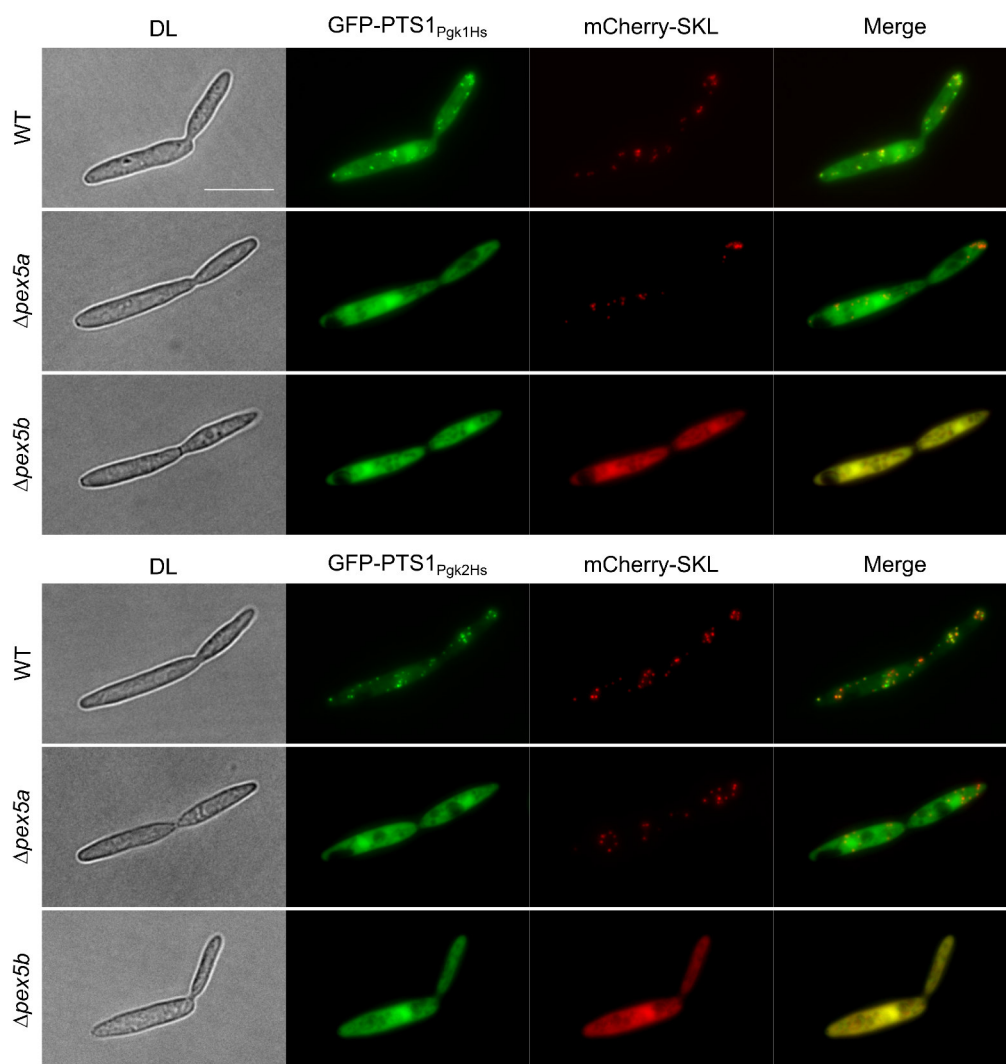


Abbildung 15: Einige Proteine lokalisieren peroxisomal in Abhängigkeit von Pex5a und Pex5b. Obwohl die Fusionsproteine aus GFP und den letzten zwölf Aminosäuren der Proteine Pgc1 und Pgc2 aus *H. sapiens* im WT peroxisomal lokalisierten, zeigten diese Proteine ausschließlich zytosolische Lokalisierung, wenn entweder *pex5a* oder *pex5b* deletiert waren. Gezeigt sind Maximum-Projektionen 1,5 μ m dicker Querschnitte durch die Mitte der Zellen. Größenstandard: 10 μ m.

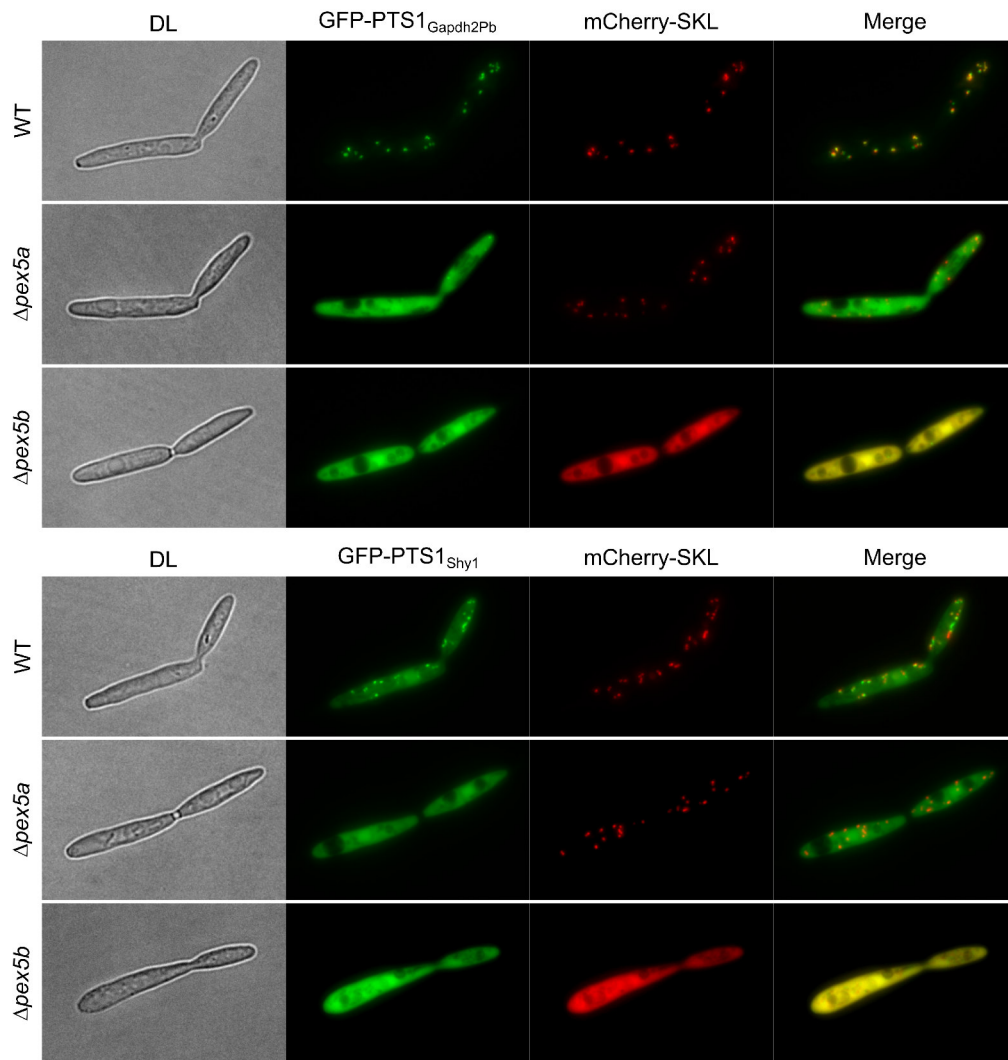


Abbildung 16: Einige Proteine lokalisieren peroxisomal in Abhängigkeit von Pex5a und Pex5b. Obwohl die Fusionsproteine aus GFP und den letzten zwölf Aminosäuren der Proteine Gapdh2 aus *P. blakesleeanus* und Shy1 aus *U. maydis* im WT peroxisomal lokalisierten, zeigten diese Proteine fast oder ausschließlich zytosolische Lokalisierung, wenn entweder *pex5a* oder *pex5b* deletiert waren. Gezeigt sind Maximum-Projektionen 1,5 μ m dicker Querschnitte durch die Mitte der Zellen. Größenstandard: 10 μ m.

sowohl in $\Delta pex5a$ als auch in $\Delta pex5b$ fast oder ausschließlich zytosolisch, obwohl sie peroxisomales Targeting im Wildtyp aufwiesen (Tabelle 1, Abbildungen 15 und 16). Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Proteine von Pex5a erkannt und nur in Gegenwart dieses PTS1-Rezeptors ins Peroxisom transloziert werden.

Das peroxisomale Targeting bestimmter Isoformen von Gapdh und Pkg ist im Pilzreich konserviert und findet sich auch bei Säugetieren [130]. *U. maydis* Shy1 ist eine Salicylathydroxylase, die für das Wachstum auf Salicylsäure benötigt wird und die als C-terminale mCherry-HA-Fusion im Zytosol lokalisiert [207]. Um die intrazelluläre Lokalisierung des Proteins bei N-terminaler Fusion zu überprüfen, wurde das *full-length* Protein Shy1 an GFP fusioniert. Das Protein GFP-Shy1 lokalisierte in *U. maydis*-Zellen zytosolisch und nicht peroxisomal (Abbildung 17).

Da sich die intrazelluläre Lokalisierung von peroxisomalen Matrixproteinen in dem Ascomyceten

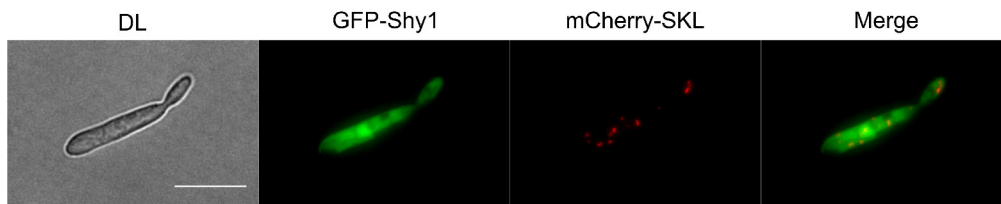


Abbildung 17: **Shy1 lokalisiert nicht im Peroxisom.**

Obwohl GFP-PTS1_{Shy1} peroxisomal lokalisierte, verbleibt das *full-length* Protein, fusioniert an GFP, im Zytosol. Gezeigt sind Maximum-Projektionen eines 1,5 µm dicken Querschnitts durch die Zelle. Größenstandard: 10 µm.

S. cerevisiae und dem Basidiomyceten *U. maydis* unterscheiden kann [130], sollte die Lokalisierung auch in dieser Hefe untersucht werden. Dafür wurde ein konstitutiv GFP-Sps19p exprimierender Hefestamm mit Plasmiden, die die Fusionsproteine kodieren, transformiert. In diesem Fall wurden die letzten zwölf Aminosäuren der Enzyme P_{gk1} und 2 aus *H. sapiens*, Gapdh2 aus *P. blakesleeanus* und Shy1 aus *U. maydis* an RFP fusioniert. Interessanterweise zeigen drei der vier RFP-PTS1-Proteine kein peroxisomales Targeting in dieser Hefe; nur GFP-PTS1_{Shy1} lokalisiert, zumindest teilweise, peroxisomal (Abbildung 18).

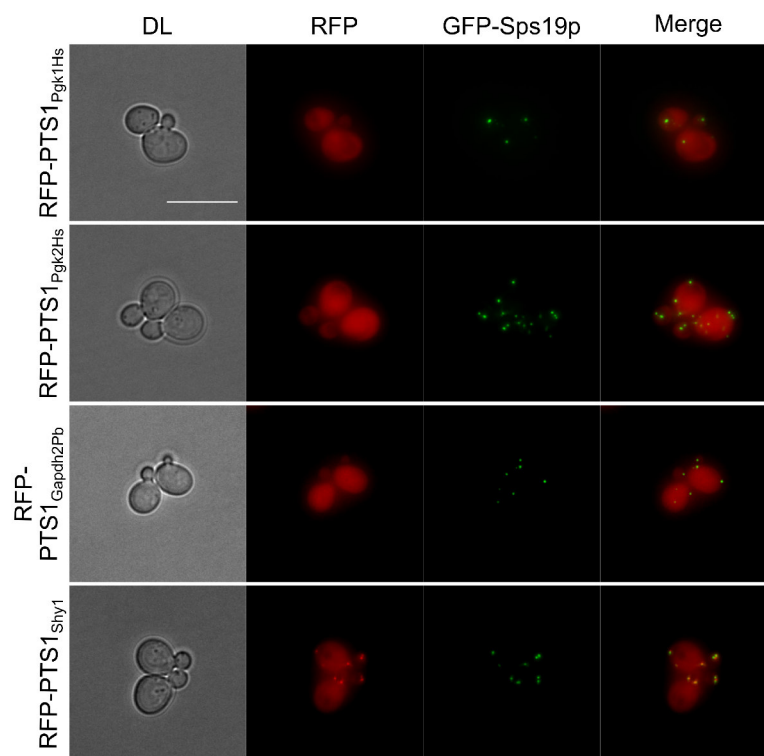


Abbildung 18: Nur eins von vier PTS1-Proteinen, deren peroxisomales Targeting in *U. maydis* sowohl von Pex5a als auch von Pex5b abhängt, lokalisiert auch peroxisomal in *S. cerevisiae*.

Die letzten zwölf Aminosäuren der Proteine P_{gk1} und P_{gk2} aus *H. sapiens*, Gapdh2 aus *P. blakesleeanus* und Shy1 aus *U. maydis* wurden an RFP fusioniert und in der Bäckerhefe exprimiert. Dabei zeigte nur eines der vier Fusionsproteine peroxisomales Targeting, obwohl alle vier Proteine in *U. maydis* WT-Zellen peroxisomal lokalisierten. Gezeigt sind Maximum-Projektionen. Größenstandard: 10 µm.

2.6.2 Generierung chimärer Pex5-Proteine

Nachdem einige Proteine nur dann in den Peroxisomen lokalisierten, wenn keiner der beiden PTS1-Rezeptoren deletiert war (Abschnitte 2.4.1 und 2.6.1), stellte sich die Frage, ob diese Pex5a-Targets von der TPR-Domäne dieses Rezeptors erkannt und gebunden werden. Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurden chimäre Pex5-Proteine generiert. Diese Pex5-Chimären sind aus der unstrukturierten NTD des einen Pex5-Proteins und der strukturierten TPR-Domäne des anderen Pex5-Paralogs zusammengesetzt. Die Trennung bzw. chimäre Fusion der Pex5-Proteine erfolgte unmittelbar vor dem ersten TPR-Repeat.

Zuerst wurden die chimären Proteine Pex5a:TPR_{Pex5b} und Pex5b:TPR_{Pex5a} unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promoters in den *sdh2*-Lokus integriert. Nachdem die chimären Pex5-Proteine teilweise den Deletionsphänotyp der Einzeldelationen für die PTS1-Importrezeptoren unter Ölsäurebedingungen komplementieren konnten (Abbildung 34, Anhang), sollten Pex5-Chimäre von den endogenen Loci exprimiert werden. Dafür wurden die TPR-Domänen endogen jeweils durch die des anderen *pex5* ersetzt (P_{pex5a}:*pex5a*:TPR_{pex5b} und P_{pex5b}:*pex5b*:TPR_{pex5a}) (Abbildung 19). Zum einen sollte das Expressionslevel der Pex5-Proteine möglichst nicht geändert werden und zum anderen blieb so der *sdh2*-Lokus frei um die bereits vorhandenen Plasmide für die Expression von GFP-Fusionen nutzen zu können.

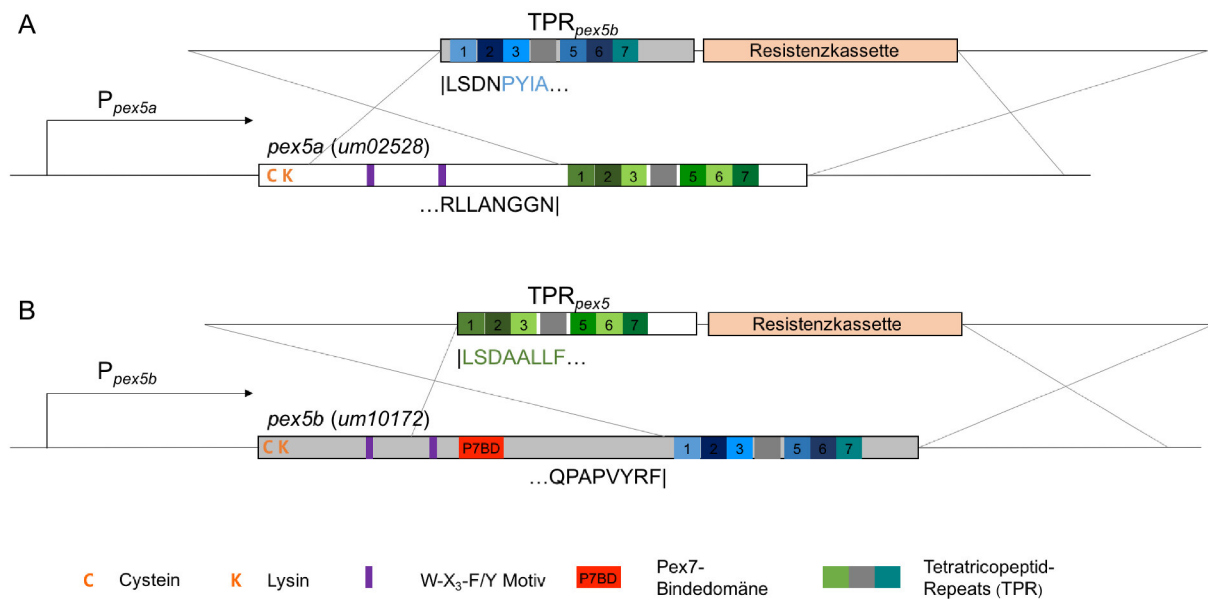


Abbildung 19: Generierung der Pex5-Chimären an den Pex5-Loki.

(A) Um vom *pex5a*-Lokus (*um02528*) ein chimäres Pex5-Protein mit der NTD von Pex5a und der TPR-Domäne von Pex5b zu exprimieren, wurde die zweite Domäne des *pex5a*-Gens mittels homologer Rekombination gegen die zweite Domäne von *pex5b* ausgetauscht. Das lineare DNA-Konstrukt, mit welchem verschiedene *U. maydis*-Stämme transformiert wurden, besteht aus jenem Teil des *pex5b*-Gens, welches die TPR-Domäne kodiert, einer Resistenzkassette für die anschließende Selektion und homologen Flanken von ungefähr 1000 bp Länge. An welcher Stelle die Fusion der Domänen beider Pex5-Proteine gewählt wurde, ist durch die angegebenen Aminosäuren angedeutet. (B) Um die Chimäre mit NTD von Pex5b und der TPR-Domäne von Pex5a unter dem *pex5b*-Promoter zu exprimieren, wurde prinzipiell genauso vorgegangen.

2.6.3 Pex5a-spezifische PTS1-Proteine werden von der TPR-Domäne dieses Rezeptors erkannt

Um herauszufinden, ob jene Proteine, deren peroxisomale Lokalisierung von beiden PTS1-Rezeptoren abhängt, von der TPR-Domäne von Pex5a erkannt werden, wurden die PTS1-Proteine in *U. maydis*-Stämmen, die chimäre Pex5-Proteine (endogen) oder Teildeletionen von Pex5b aufwiesen, exprimiert. Die intrazelluläre Lokalisierung dieser Proteine wurde exemplarisch mittels GFP-PTS1_{Gapdh2Pb} und GFP-PTS1_{Shy1} untersucht (Abbildung 20).

In der Mutante $\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$, welche über keinerlei TPR-Domänen für PTS1-Bindung verfügt, wiesen sowohl mCherry-SKL als auch beide getesteten GFP-PTS1-Proteine eine zytosolische Lokalisierung auf (Abbildung 20). Wurde die TPR-Domäne von *pex5b* deletiert, zeigten die Fusionsproteine eine peroxisomale Lokalisierung (*pex5b* ΔTPR ; Abbildung 20). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen lokalisierten die getesteten PTS1-Proteine in der Mutante *pex5b*:TPR_{*pex5a*} (TPR-Domäne von Pex5a ist zweifach vorhanden, die von Pex5b fehlt) teilweise peroxisomal und in der Mutante *pex5a*:TPR_{*pex5b*} (TPR-Domäne von Pex5b ist zweifach vorhanden, die von Pex5a fehlt) vorwiegend bzw. fast ausschließlich im Zytosol (Abbildung 20). Das PTS1-Protein mCherry-SKL lokalisierte immer peroxisomal, wenn mindestens ein Pex5 vorhanden war - unabhängig ob die TPR-Domäne von Pex5a oder Pex5b zur Verfügung stand (Abbildung 20).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteine GFP-PTS1_{Gapdh2Pb} und GFP-PTS1_{Shy1} vorwiegend von der TPR-Domäne des Importrezeptors Pex5a erkannt werden. Schlussfolgern lässt sich auch, dass die Rezeptoren Pex5a und Pex5b unterschiedliche Spezifitäten aufweisen und teilweise unterschiedliche PTS1-Proteine erkennen und importieren.

2.6.4 Konservierte Aminosäuren innerhalb der TPR-Domänen von Pex5-Proteinen sind auch in *U. maydis* vorhanden

Mittels Kristallisation und Röntgenanalyse wurde die Struktur von Pex5-Proteinen vom Menschen und von *Trypanosomas brucei* unter verschiedenen Bedingungen (beispielsweise mit gebundenem Cargo oder ohne) untersucht [108, 114, 208, 209, 210, 211]. Dabei zeigte sich, dass die NTD des Proteins relativ unstrukturiert ist, weshalb nur die Struktur der C-terminalen Domäne des Proteins, welche die TPR-Domäne enthält, aufgelöst werden konnte. Außerdem enthüllten die Strukturen der TPR-Domäne von Pex5 des Menschen im Komplex mit verschiedenen PTS1, dass die PTS1-Domäne über spezifische Interaktionen mit vier Asparaginresten der TPR-Repeats erkannt wird und weitere Aminosäuren mit dem PTS1 interagieren [108, 114]. Dabei ist die Interaktion vom PTS1 mit den Asparaginresten konserviert und die weiteren Interaktionen können sich je nach PTS1-Motiv unterscheiden [15, 114]. Ein Vergleich mit Kristallstrukturen von Pex5 von *T. brucei* in Bindung mit verschiedenen PTS1-Signalen [209] und ein Sequenz-Alignment von TPR-Domänen der Pex5-Proteine von *H. sapiens*, *T. brucei*, *A. thaliana* und *S. cerevisiae* zeigte, dass die PTS1-bindenden Aminosäurereste in verschiedenen Spezies konserviert sind [15].

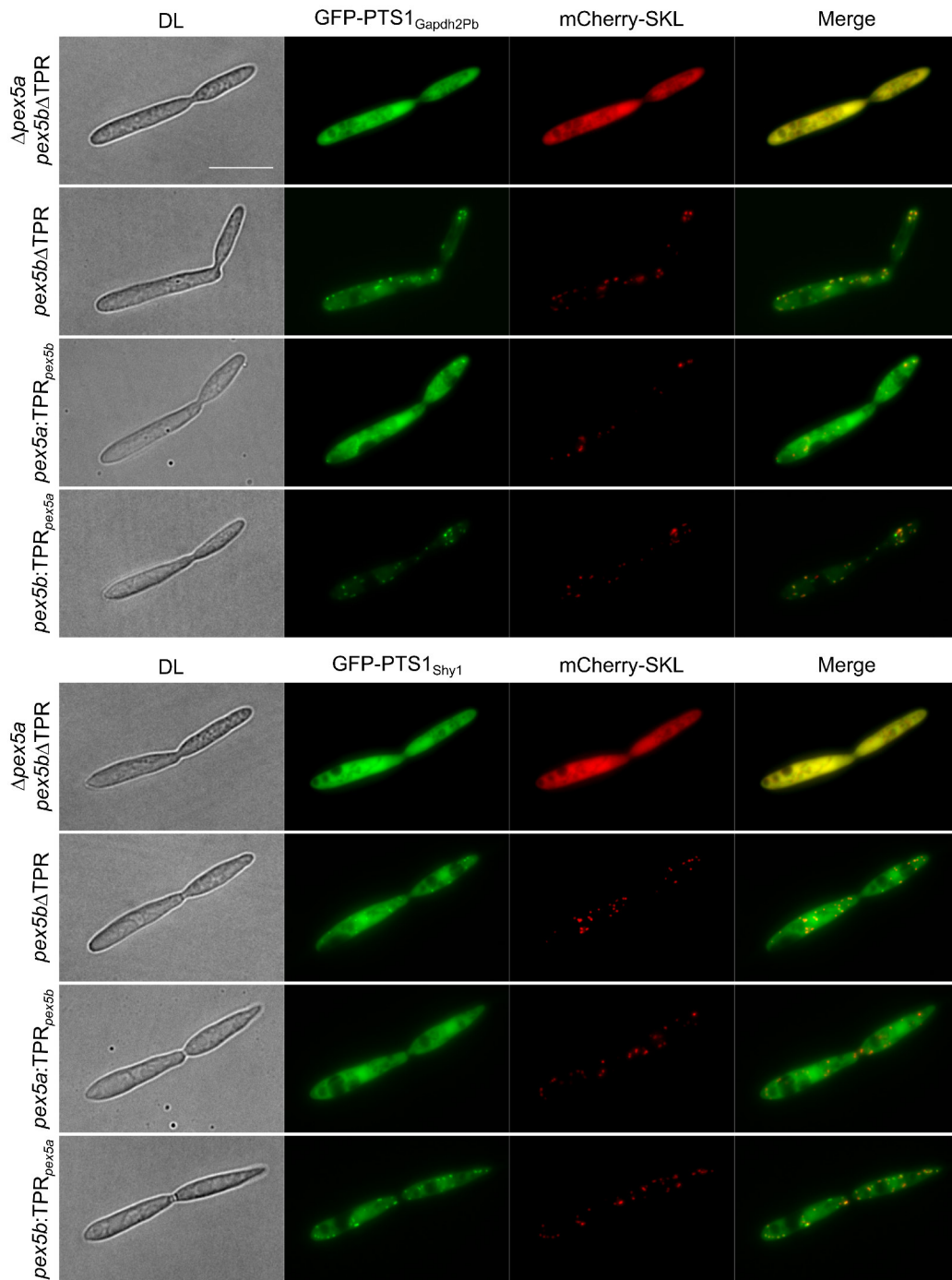


Abbildung 20: Die Proteine GFP-PTS1_{Gapdh2Pb} und GFP-PTS1_{Shy1} werden vorwiegend von Pex5a erkannt.

Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisierung der beiden peroxisomalen Matrixproteine GFP-PTS1_{Gapdh2Pb} und GFP-PTS1_{Shy1} in verschiedenen *U. maydis*-Stämmen. Ohne ein funktionelles Pex5-Protein ($\Delta pex5a$ $pex5b\Delta TPR$) verbleiben beide GFP-PTS1-Proteine wie auch mCherry-SKL im Zytosol. mCherry-SKL wird immer dann ins Peroxisom transloziert, wenn mindestens ein funktionelles Pex5 vorhanden ist. Die Effizienz des peroxisomalen Targetings der gezeigten GFP-PTS1-Proteine allerdings variiert je nach Stamm: Der Großteil der Proteine (GFP-PTS1_{Gapdh2Pb}) oder möglicherweise aller Proteine (GFP-PTS1_{Shy1}) verbleiben im Zytosol, wenn die TPR-Domäne von Pex5a nicht vorhanden ist ($pex5a:TPR_{pex5b}$); das peroxisomale Targeting nimmt zu, wenn die TPR-Domäne von Pex5a entweder einfach ($pex5b\Delta TPR$) oder zweifach ($pex5b:TPR_{pex5a}$) vorhanden ist.

Um herauszufinden, ob die Pex5-Proteine von *U. maydis* ebenfalls diese konservierten Aminosäurereste aufweisen und ob sich die beiden PTS1-Rezeptoren Pex5a und Pex5b voneinander unterscheiden, wurde ein Sequenz-Alignment durchgeführt (Abbildung 32, Anhang). Verglichen wurden die Pex5-Proteine von *H. sapiens*, *T. brucei*, *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *N. crassa*, *C. neoformans* und *U. maydis*. Das Alignment wurde mit dem „Multiple Sequence Alignment“-Tool MUSCLE durchgeführt [212, 213, 214, 215]. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäurereste auch in beiden Pex5-Proteinen von *U. maydis* konserviert sind und sich Pex5a und Pex5b in keinem der konservierten Reste voneinander unterscheiden (Abbildung 32, Anhang).

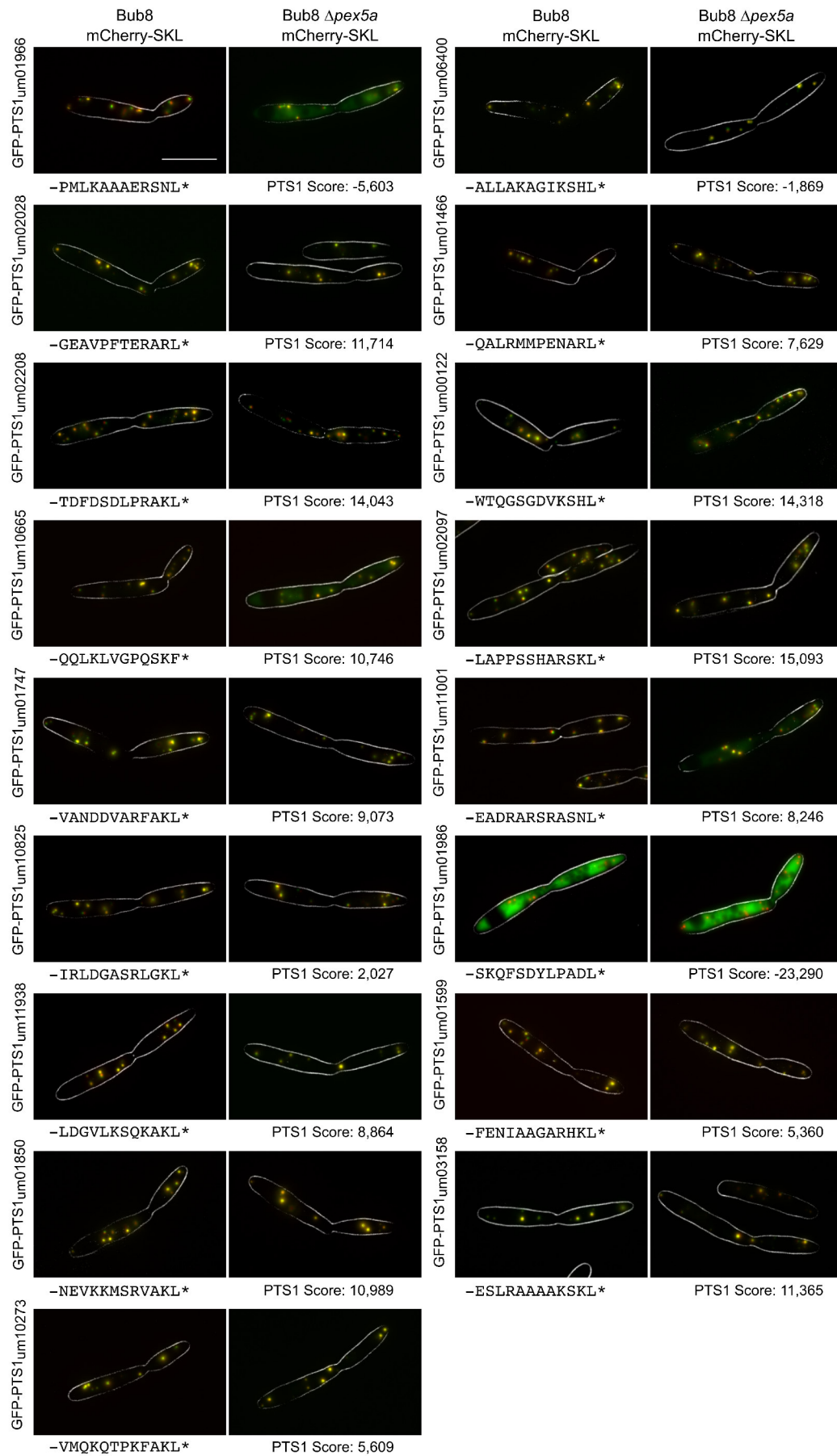
2.6.5 Einige Enzyme der β -Oxidation werden bevorzugt von Pex5a erkannt

Eine Deletion von *pex5a* führt zu einem signifikant schlechteren Wachstum der Zellen unter Ölsäurebedingungen (Abbildung 9). Da eine *pex5a*-Deletion auch nicht durch eine verstärkte Expression von *pex5b* komplementiert werden konnte (Abbildung 11), stellte sich die Frage, ob es PTS1-Proteine gibt, deren peroxisomales Targeting für die β -Oxidation von Fettsäuren notwendig ist und die bevorzugt von Pex5a und nicht Pex5b erkannt werden. Enzyme, die am peroxisomalen Fettsäureabbau beteiligt sind und ein mögliches PTS1 besitzen [163], sollten auf peroxisomales Targeting in *U. maydis* WT-Zellen und in $\Delta pex5a$ -Mutanten untersucht werden. Dafür wurden die letzten zwölf Aminosäuren dieser Enzyme an GFP fusioniert und die intrazelluläre Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (Abbildung 21).

Die Vorhersage des peroxisomalen Targetings mittels PTS1-Predictor [105, 106] war sehr unterschiedlich für die einzelnen Proteine und reichte von hohen positiven Werten (peroxisomale Lokalisierung) über Werte um Null (teilweise/möglicherweise peroxisomal) bis hin zu einem stark negativen Wert (keine peroxisomale Lokalisierung). Das PTS1-Motiv von *um01986* mit der Vorhersage -23,290 vermittelte tatsächlich keine peroxisomale Lokalisierung, das GFP-Signal war zytosoplasmatisch sichtbar (Abbildung 21). Der Großteil der getesteten GFP-PTS1-Proteine zeigte sowohl in WT- als auch in $\Delta pex5a$ -Zellen ausschließlich peroxisomale Lokalisierung (Abbildung 21). Die drei Fusionsproteine mit den PTS1 von *Um01966*, *Um10665* und *Um11001* zeigten zwar ausschließlich peroxisomales Targeting in WT-Zellen, verblieben aber in *pex5a*-Deletionsmutanten zum Teil im Zytosol (Abbildung 21).

Abbildung 21: Der Großteil der am Fettsäureabbau beteiligten Enzyme besitzt ein PTS1 (nächste Seite).

Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisierung verschiedener Fusionsproteine aus GFP und der C-Termini von am Fettsäureabbau beteiligten Enzyme. Die letzten zwölf Aminosäuren des Proteins *Um01986* haben nicht nur eine schlechte Vorhersage im PTS1-Predictor, sondern sie vermitteln auch kein peroxisomales Targeting von GFP und stellen somit kein PTS1-Motiv dar. Die übrigen getesteten C-Termini fungieren als PTS1, aber nicht alle vermitteln im WT und in der $\Delta pex5a$ -Mutante gleichermaßen peroxisomale Lokalisierung von GFP. Die GFP-Fusionsproteine mit PTS1 von *um01966*, *um10665* und *um11001* zeigen in WT-Zellen ausschließlich peroxisomales Targeting, lokalisieren in $\Delta pex5a$ aber mitunter im Zytosol. Maximum-Projekten von 1,5 μm dicker Querschnitte der Zellen. Größenstandard: 10 μm .



Um zu überprüfen, ob die Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 vorwiegend oder ausschließlich von Pex5a erkannt und importiert werden, wurden diese Proteine als Vollängenkonstrukte N-terminal an GFP fusioniert und die Lokalisierung innerhalb der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 22). In WT-Zellen zeigten alle drei Fusionsproteine ausschließlich peroxisomale Lokalisierung. In *U. maydis*-Stämmen mit $\Delta pex5a$ verschlechterte sich das peroxisomale Targeting für alle drei GFP-Fusionsproteine (Abbildung 22). Die peroxisomale Lokalisierung von GFP-Um01966 war in $\Delta pex5a$ -Zellen kaum sichtbar, weil der Großteil der Proteine im Zytosol verblieb und das peroxisomale Signal überstrahlte (Abbildung 22).

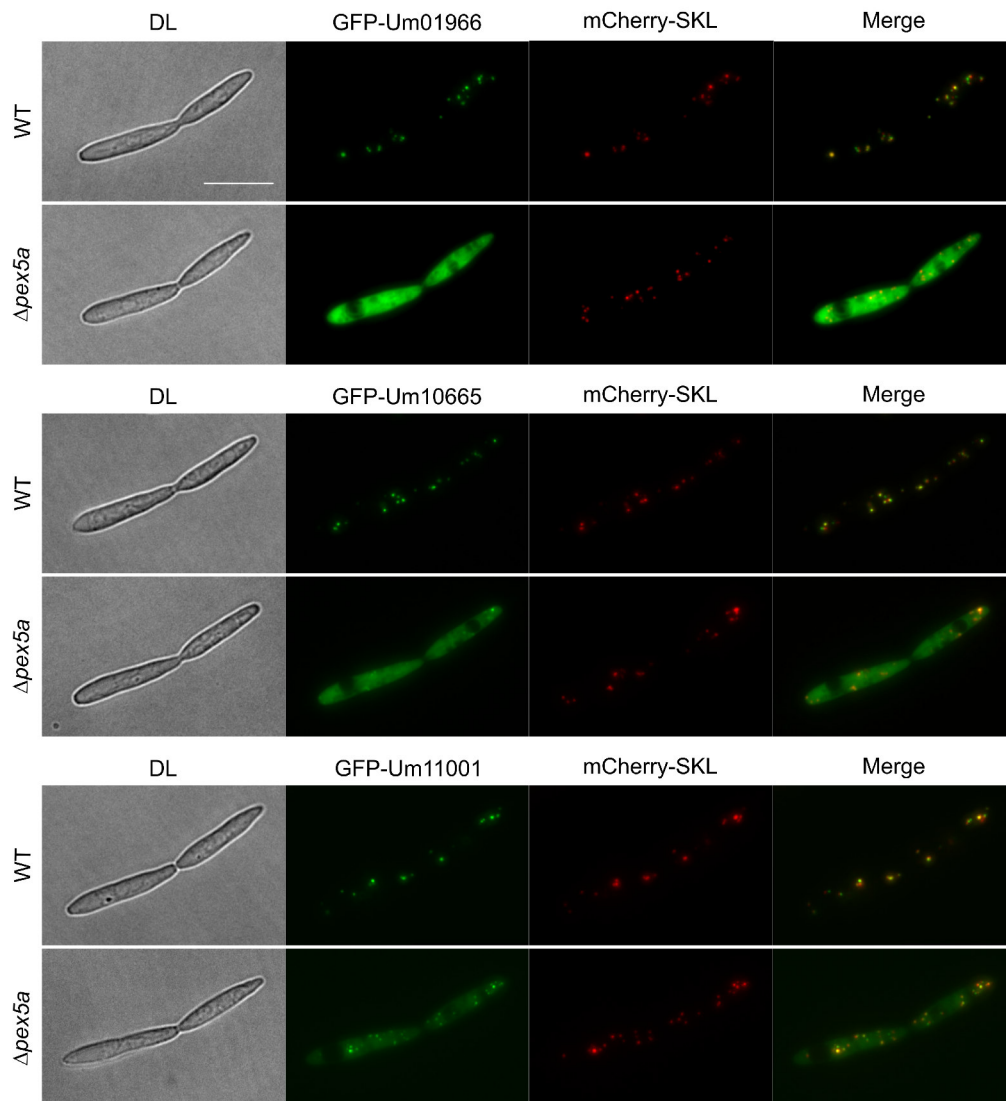


Abbildung 22: Das peroxisomale Targeting von Um01966, Um10665 und Um11001 nimmt ab, wenn *pex5a* deletiert ist.

Die Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 wurden N-terminal an GFP fusioniert und ihre intrazelluläre Lokalisierung untersucht. Im WT zeigen alle drei Enzyme, die an der peroxisomalen β -Oxidation beteiligt sind, Co-Lokalisation mit dem peroxisomalen Matrixprotein mCherry-SKL. Wesentlich schlechter funktioniert das peroxisomale Targeting, wenn der PTS1-Rezeptor *pex5a* deletiert ist. Maximum-Projektionen von 1,5 μm . Größenstandard: 10 μm .

2.6.6 Um01966, Um10665 und Um11001 werden mit verändertem PTS1 unabhängig von Pex5a ins Peroxisom importiert

Sowohl Fusionen der letzten zwölf Aminosäuren (PTS1) als auch der *full-length* Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 an GFP vermittelten peroxisomale Lokalisierung in WT-Zellen, allerdings nahm die Effizienz des Targetings deutlich ab, wenn *pex5a* deletiert war. Um zu überprüfen, ob das bessere peroxisomale Targeting dieser Enzyme und ihrer PTS1 in Anwesenheit von Pex5a über die PTS1 dieser Enzyme vermittelt wird, wurde das C-terminale Ende dieser Proteine verändert. An das endogene PTS1-Motiv wurden zwölf weitere Aminosäuren fusioniert, die die Vorhersage des peroxisomalen Targetings laut PTS1 Predictor [105, 106] wesentlich verbessern (+13,242) und die auch das Protein mCherry-SKL aufweist. Es wurde überprüft, ob sich die Lokalisierung der Enzyme mit optimiertem PTS1 in $\Delta pex5a$ -Mutanten im Vergleich zu den Enzymen mit endogenem PTS1 veränderte (Abbildung 23). Dafür wurden die GFP-Fusionen in den *sdh2*-Lokus integriert und unter dem *etef*-Promoter exprimiert.

Das optimierte PTS1-Signal änderte im WT nichts an der Lokalisierung der Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 (Abbildung 23). Anders als Proteine mit WT PTS1 wiesen die Proteine mit dem veränderten PTS1 keinerlei zytoplasmische Lokalisierung in $\Delta pex5a$ -Zellen auf, sondern zeigten ebenso wie mCherry-SKL ausschließlich peroxisomales Targeting (Abbildung 23). Daraus lässt sich schließen, dass die Proteine mit dem optimierten PTS1 mit höherer Effizienz als die Ursprungsvarianten von Pex5b erkannt und ausschließlich von diesem ins Peroxisom importiert werden können. Die WT Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 hingegen werden bevorzugt von Pex5a in die peroxisomale Matrix transloziert.

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob sich die Fähigkeit, Fettsäuren zu verstoffwechseln, für $\Delta pex5a$ -Stämme ändert, wenn das PTS1 der Enzyme Um01966, Um10665, Um11001 optimiert wird. Dafür wurden endogen an *um01966*, *um10665* und *um11001* die zwölf Aminosäuren mit SKL fusioniert. Nach Transformation der *knock in*-Konstrukte in *U. maydis* wurde die Integration und die Richtigkeit des PTS1 über PCR und Sequenzierung bestätigt. Um den Einfluss der optimierten PTS1 auf das Wachstum unter Fettsäurebedingungen zu untersuchen, wurden die Stämme mit *um01966*-SKL, *um10665*-SKL und *um11001*-SKL sowohl im WT- als auch im $\Delta pex5a$ -Hintergrund zusammen mit den Ausgangsstämmen als Kontrolle auf verschiedene Agar-Platten getropft (Abbildung 24). Die YNB-Agar-Platten enthielten neben 0,2 % Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle verschiedene Kohlenstoffquellen: 1 % Glukose, 0,2 % Myristinsäure (C14), 0,2 % Ölsäure (C18:1) oder 0,2 % Linolsäure (C18:2) (Abbildung 24). Unter Glukosebedingungen zeigten alle Stämme nach dreitägiger Inkubation bei 23 °C ein vergleichbares Wachstum (Abbildung 24). Stand eine Fettsäure als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen im Bub8-WT-Hintergrund und den Zellen mit Deletion für *pex5a*. Sobald der PTS1-Rezeptor deletiert war, wuchsen die Zellen auf Myristin- bzw. Ölsäure wesentlich schlechter als der WT und zeigten keinerlei Wachstum auf Linolsäure (Abbildung 24). Im WT-Hintergrund hatte das veränderte PTS1 der β -Oxidationsenzyme keinen Einfluss auf das Wachstum unter jeder der gezeigten Bedingungen.

(Abbildung 24). Auch für $\Delta pex5a$ -Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Ausgangsstamm und jenen mit optimiertem PTS1-Motiv, wenn Myristinsäure, Ölsäure oder Linolsäure als Kohlenstoffquelle zur Verfügung standen (Abbildung 24).

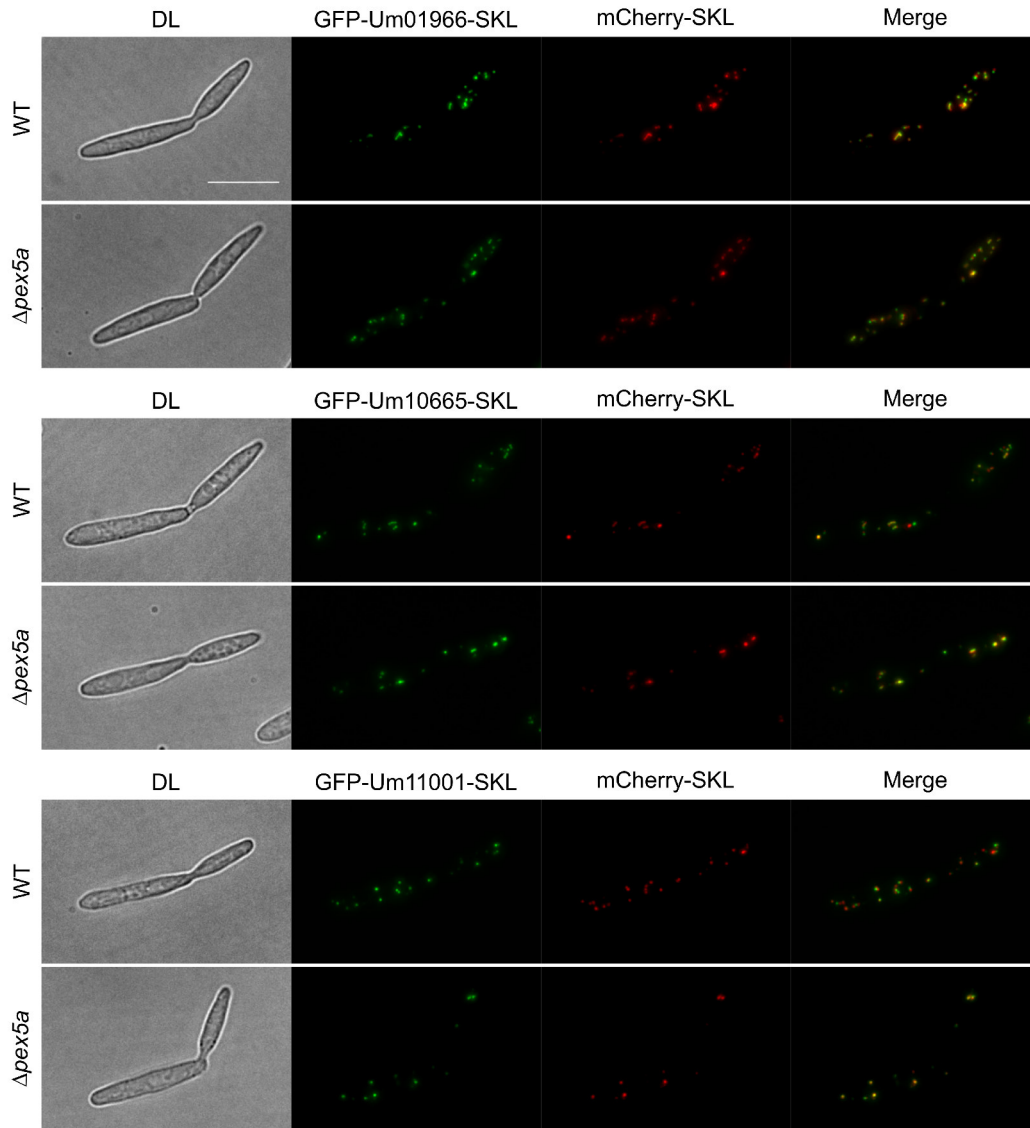


Abbildung 23: Durch Optimierung des PTS1 können die Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001 effektiv von Pex5b erkannt werden.

Gezeigt sind die intrazelluläre Lokalisierung der Proteinfusionen von Um01966, Um10665 und Um11001 N-terminal an GFP und C-terminal an ein optimiertes PTS1 (SKL). Sowohl im WT als auch in der *pex5a*-Deletionsmutante zeigen die Fusionsproteine ausschließlich peroxisomales Targeting, welches vom PTS1-Rezeptor Pex5b vermittelt werden kann. Maximum-Projektionen von 1,5 μm . Größenstandard: 10 μm .

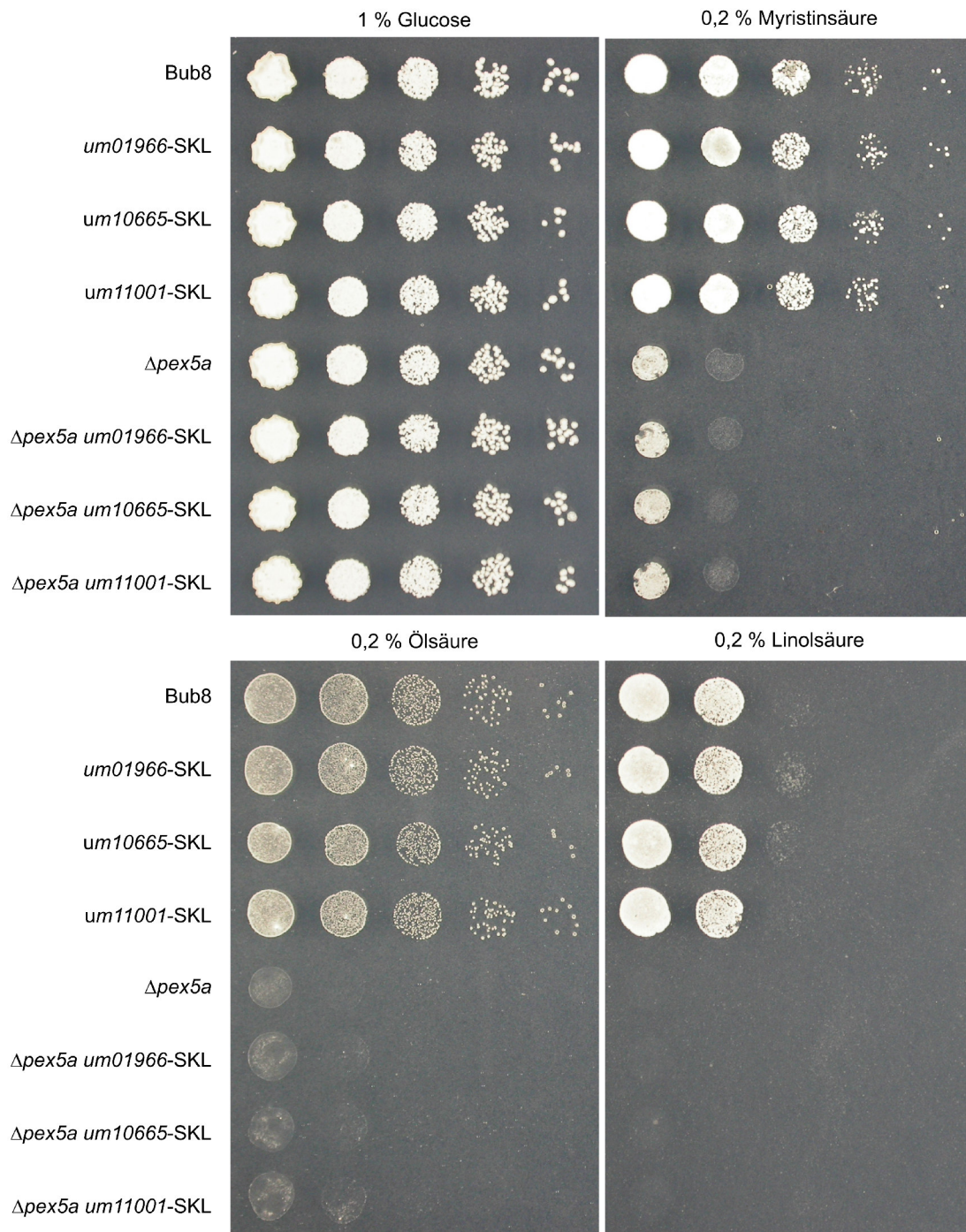


Abbildung 24: Ein optimiertes PTS1 einzelner, Pex5a-spezifischer β -Oxidationsenzyme verbessert nicht das Wachstum der $\Delta pex5a$ -Zellen unter Fettsäurebedingungen.

Um den Einfluss des PTS1 der Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001 in einer *pex5a*-Deletionsmutante zu überprüfen, wurde endogen das PTS1 dieser Enzyme optimiert. Das geänderte SKL-Motiv wurde effektiv von Pex5b erkannt und die Enzyme über diesen PTS1-Rezeptor ins Peroxisom transportiert. Die Stämme Um01966-SKL, Um10665-SKL und Um11001-SKL in Bub8 und in Bub8 $\Delta pex5a$ wurden auf YNB-Agar, der mit Glukose (1 %) oder verschiedenen Fettsäuren (0,2 %) als Kohlenstoffquelle versetzt war, in zehnfachen Verdünnungsstufen, beginnend mit $OD_{600} = 1$, getropft. Nach drei Tagen Inkubation bei 23 °C waren deutliche Wachstumsunterschiede zwischen den Stämmen im WT- und im Deletionshintergrund unter Fettsäurebedingungen sichtbar, wobei die Bub8-Stämme Myristin- und Ölsäure vollständig und Linolsäure eingeschränkt als Kohlenstoffquelle nutzen konnten. Im Gegensatz zeigten die $\Delta pex5a$ -Stämme ein stark reduziertes (Myristin- und Ölsäure) oder gar kein Wachstum (Linolsäure). Dabei spielte es keine Rolle, welches PTS1-Motiv die Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001 aufwiesen.

2.6.7 Nicht allein die TPR-Domäne von Pex5a ist verantwortlich für die Bindung der Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001

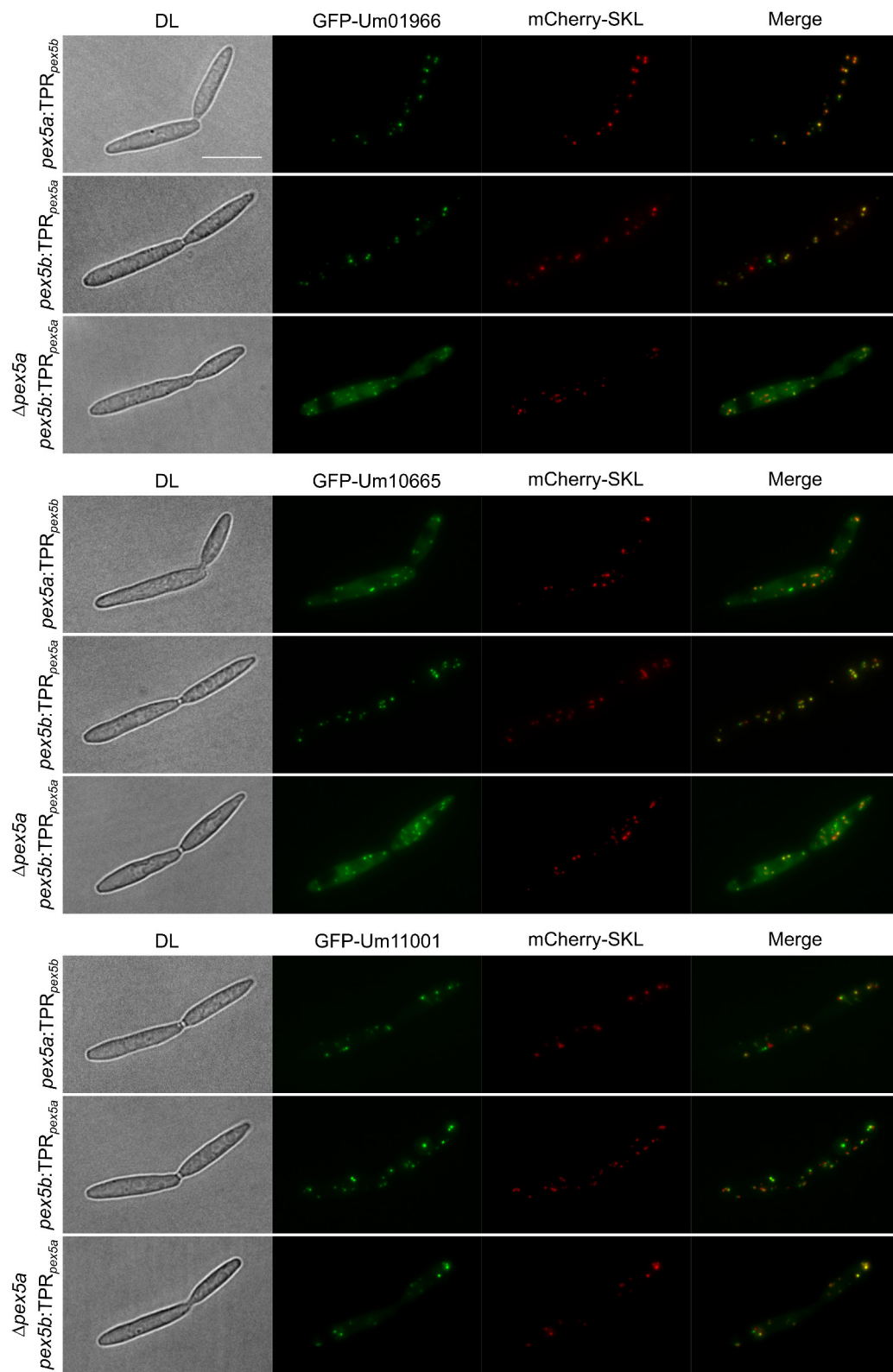
Nachdem die vorangegangenen Ergebnisse nahelegten, dass die Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 nur in Anwesenheit von Pex5a effizient in die Peroxisomen transportiert werden, sollte überprüft werden, ob die peroxisomale Lokalisierung dieser am Fettsäureabbau beteiligten Enzyme von der TPR-Domäne von Pex5a abhängt. Dafür wurden N-terminale GFP-Fusionen dieser Enzyme unter dem *etef*-Promoter in *U. maydis*-Stämmen mit Pex5-Chimären exprimiert (Abbildung 25).

Wenn das PTS1 der β -Oxidationsenzyme von Pex5a erkannt, gebunden und anschließend über Pex5a (in Abhängigkeit von Pex5b) in die Peroxisomen importiert wird, sollte der peroxisomale Import dieser Enzyme noch effizienter sein, wenn beide Pex5-Proteine die TPR-Domäne von Pex5a aufweisen (*pex5b:TPR_{pex5a}*). Tatsächlich weisen jene Zellen punktförmige GFP-Signale auf, die mit mCherry-SKL co-lokalisieren (Abbildung 25). Außerdem sollten die GFP-Proteine auch dann noch peroxisomales Targeting aufweisen, wenn *pex5a* deletiert ist, aber Pex5b die TPR-Domäne von Pex5a aufweist. Tatsächlich zeigte der Stamm $\Delta pex5a$ *pex5b:TPR_{pex5a}* weiterhin ausschließlich eine peroxisomale Lokalisierung von GFP-Um11001, wohingegen das Targeting von GFP-Um01966 und GFP-Um10665 weniger effizient war als in *pex5b:TPR_{pex5a}* (Abbildung 25). Das Referenzprotein mCherry-SKL lokalisierte in beiden Stämmen ausschließlich peroxisomal (Abbildung 25).

Umgekehrt sollten die GFP-Proteine in einem Stamm ohne TPR-Domäne von Pex5a - wenn das effiziente Targeting eben von dieser Domäne abhängt - eine intrazelluläre Lokalisierung wie in einem $\Delta pex5a$ -Stamm aufweisen. Im *U. maydis* Stamm mit *pex5a:TPR_{pex5b}* lokalisierten GFP-Um01966 und GFP-11001 jedoch ausschließlich peroxisomal. Für GFP-Um10665 konnte sowohl eine peroxisomale als auch zytosolische Lokalisierung beobachtet werden (Abbildung 25). In allen drei Fällen aber war das peroxisomale Targeting im *pex5a:TPR_{pex5b}*-Stamm effizienter als in einer *pex5a*-Deletionsmutante (Abbildung 22).

Abbildung 25: Effizientes peroxisomales Targeting von Um01966, Um10665 und Um11001 hängt nicht allein von der TPR-Domäne von Pex5a ab (nächste Seite).

Um die Abhängigkeit der peroxisomalen β -Oxidationsenzyme Um01966, Um10665 und Um11001 von den PTS1-Rezeptoren zu untersuchen, wurden GFP-Fusionen dieser Enzyme in verschiedenen Stämmen mit Pex5-Chimären exprimiert. Alle drei Fusionsproteine lokalisierten in *pex5b:TPR_{pex5a}*, einem Stamm ohne die C-terminale-Domäne von Pex5b, ausschließlich peroxisomal - folglich hängt das peroxisomale Targeting dieser Enzyme nicht von der TPR-Domäne von Pex5b ab. Überraschenderweise zeigen die Proteine Um01966 und Um11001 auch in der Chimäre ohne TPR-Domäne von Pex5a (*pex5a:TPR_{pex5b}*) ausschließlich peroxisomales Targeting, wobei sie auch in dem Stamm $\Delta pex5a$ *pex5b:TPR_{pex5a}* besser als zuvor in $\Delta pex5a$ lokalisieren. Dies spricht dafür, dass die TPR-Domäne von Pex5a nicht allein die Proteine Um01966 und Um11001 bindet, sondern dass auch die NTD von Pex5a eine helfende Funktion übernimmt. Dies trifft auch auf das Protein Um10665 zu, das nur ausschließlich peroxisomal lokalisiert, wenn das vollständige Pex5a-Protein (*pex5b:TPR_{pex5a}*) vorhanden ist. Maximum-Projektionen von 1,5 μm . Größenstandard: 10 μm .



Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 bevorzugt von Pex5a und nur schwach von Pex5b gebunden werden. Die Effizienz des Targetings dieser peroxisomalen Matrixproteine aber hängt von weiteren Faktoren ab; in diesem Falle von der Anwesenheit der NTD von Pex5a.

Um zu testen, ob die NTD von Pex5a die hier untersuchten Enzyme bindet und ob das peroxisomale Targeting der Proteine Um01966, Um10665 und Um11001 sogar ohne Bindung an die TPR-Domäne stattfinden kann, wurden die PTS1 der Enzyme durch C-terminale Fusion von drei Alanin-Resten maskiert. Dadurch verschlechterte sich die Vorhersage der peroxisomalen Lokalisierung mittels PTS1-Predictor [105, 106] drastisch (Um01966+AAA: -33,456, Um10665+AAA: -34,269, Um11001+AAA: -33,064). Exprimiert wurden die GFP-Protein+AAA-Fusionen unter dem *etef*-Promoter. Die Enzyme Um10665 und Um11001 zeigten keinerlei peroxisomales Targeting mehr, während Um01966 trotz AAA-Fusion weiterhin ausschließlich peroxisomal lokalisierte Abbildung [26].

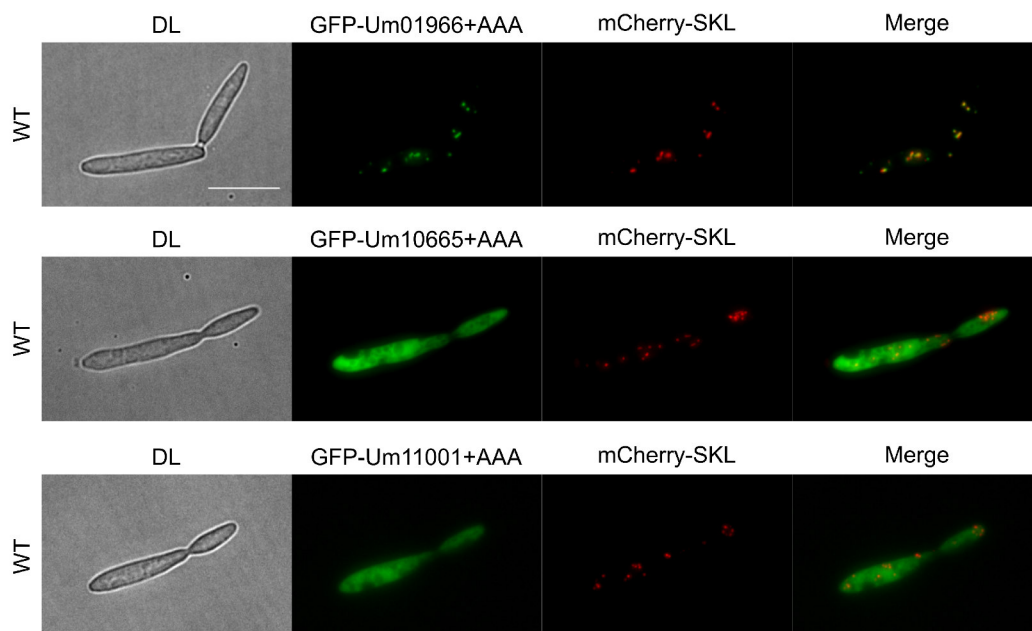


Abbildung 26: **Um01966 lokalisiert auch ohne funktionelles PTS1 peroxisomal.**

Um zu überprüfen, ob das PTS1 der β -Oxidationsenzyme für das peroxisomale Targeting essentiell ist, wurde das Targeting-Signal durch Fusion von drei Alanin-Resten blockiert. Ohne funktionelles PTS1 verblieben die Proteine GFP-Um10665+AAA und GFP-Um11001+AAA im Zytosol, während die Blockade des PTS1 von Um01966 nichts am peroxisomalen Targeting dieses Enzyms änderte. Maximum-Projektionen von 1,5 μm . Größenstandard: 10 μm .

2.7 Sowohl Pex5a als auch Pex5b werden für das Wachstum auf Fettsäuren benötigt

Zuvor konnte gezeigt werden, dass sowohl Pex5a als auch Pex5b für das Wachstum auf Fettsäuren benötigt werden ([130], Abbildungen 9 und 11). Wenn Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, zeigt $\Delta pex5a$ ein reduziertes Wachstum, während $\Delta pex5b$ -Stämme wahrscheinlich aufgrund der Toxizität der nicht abbaubaren Zwischenprodukte am Wachstum gehindert werden bzw. sterben ([130], Abbildung 9).

Um die in dieser Arbeit behandelten Chimären näher zu charakterisieren, wurde ein Wachstumstest auf Fettsäure-haltigem YNB-Agarplatten durchgeführt (Abbildung 27). Neben Ölsäure (C18:1) wurden Myristinsäure (C14) oder Linolsäure (C18:2) als Kohlenstoffquelle verwendet. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass der PTS1-Rezeptor Pex5a nur dann funktionell ist, wenn die NTD des anderen PTS1-Rezeptors zur Verfügung steht (Abbildung 13). Zwar kann in dem Stamm $pex5b\Delta TPR$ weiterhin das PTS1-Markerprotein mCherry-SKL importiert werden, jedoch zeigte dieser Stamm ein reduziertes Wachstum unter Fettsäurebedingungen (Abbildung 27). Dies lässt vermuten, dass es PTS1-Proteine gibt, deren peroxisomale Lokalisierung notwendig ist um Fettsäuren ähnlich effizient wie der WT zu nutzen und dabei Pex5b über Pex5a als PTS1-Rezeptor bevorzugen. Gestützt wird die Vermutung dadurch, dass der Stamm $pex5b:TPR_{pex5a}$ ein vergleichbares Wachstum zeigte (Abbildung 27). Dieser Mutante fehlt die TPR-Domäne von Pex5b und obwohl die Domäne von Pex5a zweifach vorhanden ist, konnte auch diese den Verlust der Pex5b PTS1-Bindetasche nicht komplementieren. Verzichtet werden kann allerdings auf die TPR-Domäne von Pex5a unter den gewählten Bedingungen, da der Stamm mit der Pex5-Chimäre $pex5a:TPR_{pex5b}$ ein dem WT ähnliches Wachstum aufweist (Abbildung 27). Die Mutante $\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$ wächst schlechter als die $pex5a/pex5b$ -Doppeldeletion (Abbildung 27). Beide Varianten unterscheiden sich lediglich darin, dass der Stamm $\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$ zumindest die NTD von Pex5b exprimiert. Nicht nur unter Fettsäurebedingungen scheint das alleinige Vorhandensein der NTD von Pex5b von Nachteil zu sein, auch wenn Glukose zur Verfügung stand, zeigte dieser Stamm ein reduziertes Wachstum (Abbildung 27).

Dass der Stamm $pex5a:TPR_{pex5b}$ unter Fettsäurebedingungen beinahe uneingeschränkt wächst, war überraschend, da zuvor in Abbildung 11 gezeigt werden konnte, dass $pex5b$, exprimiert unter dem Promoter von $pex5a$, nicht den Deletionsphänotyp von $pex5a$ komplementieren kann. Die beiden Stämme unterscheiden sich im Locus, von welchem die eingebrachten Konstrukte exprimiert werden. $P_{pex5a}:pex5b$ wurde einfach in den *sdh2*-Lokus integriert, wohingegen $pex5a:TPR_{pex5b}$ am endogenen $pex5a$ -Lokus mutiert wurde. Dadurch unterscheiden sich die beiden Stämme in dem Pex5-Protein, welches unter dem $pex5a$ -Promoter exprimiert wird ($pex5a$ oder $pex5a:TPR_{pex5b}$). In beiden Fällen ist ein WT $pex5b$ -Allel vorhanden. Der Deletionsphänotyp von $pex5a$ kann nur dann komplementiert werden, wenn die NTD von Pex5a exprimiert wird - unabhängig davon, ob die C-terminale Domäne mit der TPR-Domäne von Pex5a oder Pex5b stammt. Folglich ist die Expression der NTD von Pex5a von Bedeutung, wenn langkettige Fettsäuren als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen und die peroxisomale β -Oxidation zum Verstoffwechseln benötigt wird.

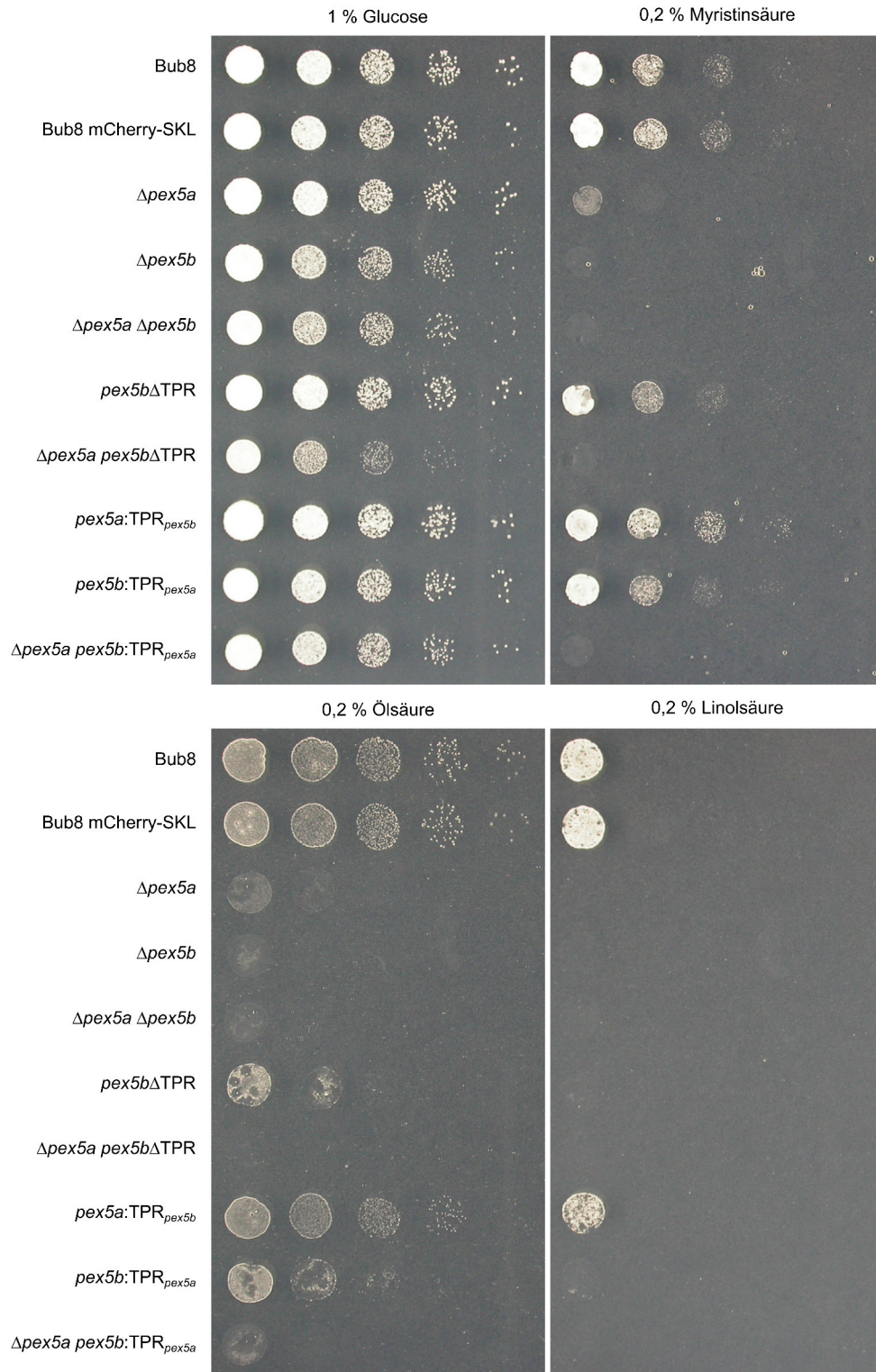


Abbildung 27: Wachstumsphänotyp verschiedener Pex5-Mutanten und -Chimären.

Gezeigt ist das Wachstum des *U. maydis*-WT-Stamms Bub8 und verschiedener Mutanten auf YNB-Agar, supplementiert mit Glukose oder verschiedenen Fettsäuren als einzige Kohlenstoffquelle. Überraschenderweise weist der Stamm mit Deletionen für *pex5a* und die C-terminale Domäne von Pex5b ($\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$) bereits auf Glukose-haltigem Agar ein stark eingeschränktes Wachstum auf und zeigt keinerlei Wachstum unter Fettsäurebedingungen. Ein untereinander vergleichbares, reduziertes Wachstum unter Fettsäurebedingungen zeigen die beiden Stämme ohne die TPR-Domäne von Pex5b ($pex5b\Delta TPR$ und $pex5b:TPR_{pex5a}$). Nahezu uneingeschränkt wächst der Stamm ohne die TPR-Domäne von Pex5a ($pex5a:TPR_{pex5b}$). Getropft wurden je 5 μ l zehnfacher Verdünnungsstufen ausgehend von $OD_{600} = 1$. Die Platten wurden zwei Tage bei 23 °C inkubiert. Der Stamm Bub8 mCherry-SKL war Ausgangsstamm für die folgenden Mutanten mit Pex5-Deletionen, -Verkürzungen oder -Fusionen.

3 Diskussion

3.1 Der PTS2-Importweg in *U. maydis* ist funktionell

Innerhalb der Eukaryoten nimmt der PTS2-Importweg je nach Reich einen unterschiedlichen Stellenwert ein. So umfassen die Proteine mit PTS2 in Pflanzen ca. ein Drittel der peroxisomalen Matrixproteine, während in Pilzen und Säugetieren nur ein geringer Teil der fürs Peroxisom bestimmten, löslichen Proteine ein N-terminales Targeting-Signal aufweist [57]. Einige phylogenetisch nicht verwandte Organismen haben diesen Importweg sogar verloren [92, 91, 93]. Der Importweg für Proteine mit N-terminalem, peroxisomalem Targeting-Signal (PTS2) wird über den konservierten Rezeptor Pex7 vermittelt. Um die Relevanz des PTS2-Proteinimports im Basidiomyceten *U. maydis* festzustellen, wurde dieser Importweg in diesem Pilz charakterisiert.

3.1.1 *UmPex7* weist die über Reichsgrenzen hinaus konservierte Struktur auf

Zu den Organismen, die den PTS2-Importweg im Laufe der Evolution verloren haben, gehört *D. melanogaster* [91]. Zwar findet sich im Genom der Fruchtfliege ein homologes Gen des PTS2-Rezeptors, aber Pex7 ist in diesem Organismus nicht mehr funktionell [91]. Auch der Basidiomycet *U. maydis* kodiert für ein mögliches Pex7-Protein (Um03596) [138]. Das Protein Um03596 ist als PTS2-Rezeptor funktionell, denn in *U. maydis* WT-Zellen wird das Protein PTS2-GFP in die Peroxisomen importiert, während es nach Deletion von *um03596* im Zytosol verbleibt.

Der konservierte PTS2-Rezeptor gehört zur WD40-Proteinfamilie, deren Mitglieder aus WD40-Repeats aufgebaut sind [131]. Pex7 bildet eine siebenblättrige Propellerstruktur aus, die aus sieben WD40-Repeats bzw. WD-ähnlichen Motiven besteht [133, 134]. Eine Datenbank für die WD40-Repeat-Proteine ist WDSPdb (<http://wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp/>) und der WD40-Repeat-Protein-Struktur-Predictor (WDSP) erkennt WD40-Domänen und identifiziert WD40-Repeats [135, 191, 192]. Für das *U. maydis* Protein Um03596 erkannte das Tool sieben WD40-Repeats, was der konservierten Struktur von Pex7 entspricht. Außerdem weist *UmPex7* den konservierten „bulge loop“ [134], der innerhalb des ersten WD40-Repeat-ähnlichen Motivs angeordnet ist, auf. Hier befindet sich zwischen dem zweiten und dritten β -Faltblatt (von vier β -Faltblättern, die ein Blatt der Propellerstruktur ausmachen) eine längere Windung als zwischen den anderen β -Faltblättern, die dem Konsensusmotiv ([N/H]-[F/Y]-G-[L/I]-[V/L/I/S/A]-G) entspricht. In *S. cerevisiae* interagieren die hydrophoben Reste dieses „bulge loops“ mit der hydrophoben Bindetasche des PTS2-Co-Rezeptors Pex21pC [134] und auch in *U. maydis* könnte über diesen die Interaktion mit dem PTS2-Co-Rezeptor erfolgen.

3.1.2 Besitzt *UmPex7* ein Motiv zum Docking an die peroxisomale Membran?

Im Gegensatz zu anderen Pex7-Proteinen weist *UmPex7* ein di-aromatisches Pentapeptid nahe am N-terminalen Ende auf. Das Vorhandensein ein oder mehrerer WxxxF/Y-Motive innerhalb der N-Termini der PTS1- und PTS2-Co-Rezeptoren ist konserviert und diese Motive vermitteln die Interaktion mit

dem Docking-Komplex in der peroxisomalen Membran [70, 107, 216, 217, 218, 219]. Dass Pex7p unabhängig von Pex18p und Pex21p bzw. Pex20p mit dem Docking-Komplex interagiert, wurde für die Hefen *S. cerevisiae* [150] und *P. pastoris* [70] gezeigt, während in Säugetierzellen das Targeting von Pex7 an die peroxisomale Membran sowohl von Pex5L als auch vom PTS2-Protein abhängt [151].

Trotz Bindung an die peroxisomale Membran in Abwesenheit der PTS2-Co-Rezeptoren weisen weder Pex7p von *S. cerevisiae* noch von *P. pastoris* ein di-aromatisches Pentapeptid auf. In *U. maydis* befindet sich das potentielle Interaktionsmotiv (WSPFF) in einem Loop zwischen zwei β -Faltblättern (Abbildung 31, Anhang) und *S. cerevisiae* und *P. pastoris* weisen an gleicher Stelle ähnliche Sequenzen (YSPFF bzw. YSPFY) auf. Um herauszufinden, ob das potentielle Motiv in UmPex7 zugänglich ist und dieses möglicherweise mit Proteinen in der peroxisomalen Membran interagieren kann, wird hier aufgrund der hohen Sequenzidentität die Kristallstruktur von ScPex7p (PDB: 3W15, [134]) herangezogen. Dabei zeigt sich, dass zumindest die aromatischen Reste der beiden Phenylalanine an der Oberfläche von Pex7p liegen (Abbildung 28). Aufgrund der konservierten Struktur von Pex7 und der hohen Sequenzidentität zwischen den beiden PTS2-Rezeptoren von *S. cerevisiae* und *U. maydis* ist es wahrscheinlich, dass das potentielle di-aromatische Pentapeptid von *U. maydis* ebenfalls teilweise an der Oberfläche von Pex7 präsentiert wird.

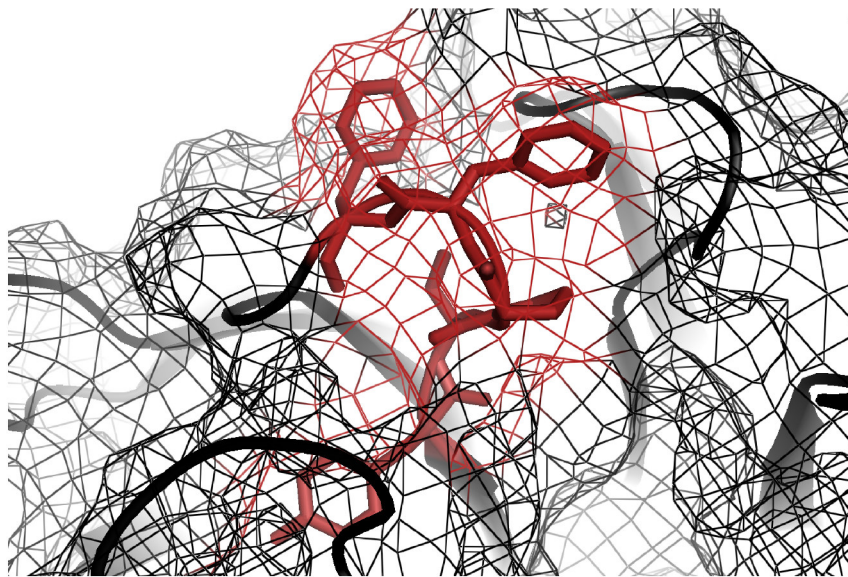


Abbildung 28: In *S. cerevisiae* ist das Motiv YSPFF in Pex7p teilweise zugänglich. Dargestellt ist die Aminosäurefolge YSPFF (rot) im *S. cerevisiae* Protein Pex7p (schwarz). Die beiden Phenylalanine präsentieren ihre hydrophoben Reste an der Oberfläche (Gitterstruktur) von ScPex7p.

Anhand von Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass das peroxisomale Membranprotein Pex14 zwei hydrophobe Bindetaschen in seiner N-terminalen Domäne (NTD) aufweist [111, 220]. Im Menschen wird über diese hydrophoben Hohlräume die Interaktion mit Pex5 und Pex19 vermittelt [111, 220, 221], wobei beide vorwiegend zytosolisch vorliegenden Proteine mit gegenläufiger Direktionalität an Pex14 binden [111]. Beide Importrezeptoren machen dabei Gebrauch von den aromatischen Resten in den WxxxF/Y-Motiven (Pex5) bzw. dem

F/YFxxxF-Motiv (Pex19) [111, 220]. Zusätzlich wird die Bindung von Pex5 bzw. Pex19 an Pex14 durch an die Motive angrenzende Aminosäurereste verstärkt [111, 220]. Auch für LVxEF innerhalb der NTD von Pex5 des Menschen konnte eine Interaktion mit den hydrophoben Bindetaschen von Pex14 gezeigt werden [196].

Aufgrund der relativ unstrukturierten NTD von Pex5 wurde bisher nur die TPR-Domäne mittels Kristallisation aufgelöst [108, 114, 208, 209, 210, 211, 222] und nicht der Teil, der die WxxxF/Y-Motive aufweist. Aus diesem Grund wurde Pex14 nur im Komplex mit kurzen Oligopeptiden, die dieses Motiv aufweisen, kristallisiert [111, 196]. Es wurde angenommen und durch die Kristallstrukturen bestätigt, dass ein WxxxF/Y-Motiv eine α -helikale Konformation annimmt, damit die aromatischen Reste beider im Motiv außen liegender Aminosäuren in dieselbe Richtung präsentiert werden [55, 108]. Zieht man die Kristallstruktur von Pex7p von *S. cerevisiae* heran (Abbildung 28), liegt die Vermutung nahe, dass auch in *U. maydis* nicht beide außenliegenden aromatischen Reste des WxxxF/Y-Motivs in dieselbe Richtung zeigen und zugänglich präsentiert werden. Ob das Motiv WSPFF in *UmPex7* nur zufällig auftritt oder tatsächlich eine Funktion im Docking an die peroxisomale Membran übernimmt, muss experimentell bestimmt werden. Auch ob *UmPex7* unabhängig vom PTS2-Co-Rezeptor an die peroxisomale Membran andocken kann, ist bisher unbekannt. Es wurden N- und C-terminale GFP-Fusionen von Pex7 auf ihre intrazelluläre Lokalisierung untersucht, die Proteine zeigten aber ausschließlich zytoplasmatische Lokalisierung (Daten nicht gezeigt). Generell wird in der Literatur, trotz Beobachtungen, dass einige Pex7-Proteine unabhängig von dem PTS2-Co-Rezeptor mit der peroxisomalen Membran interagieren [70, 150], angenommen, dass der PTS2-Rezeptor mit dem PTS2 des Cargo-Proteins und dem Co-Rezeptor interagiert und über dessen di-aromatische Pentapeptid-Motive zum Docking-Komplex gebracht wird [200]. Auch dies ist in *U. maydis* wahrscheinlich, da das mutmaßliche WxxxF/Y-Motiv ein in der Mitte befindliches Prolin aufweist, wodurch die normalerweise α -helikale Struktur des Motivs verhindert wird und die beiden außen liegenden Aminosäuren ihre Reste nicht in dieselbe Richtung orientieren. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *UmPex7* nur in Abhängigkeit seines Co-Rezeptors Pex5b als PTS2-Importrezeptor fungiert.

3.1.3 Nur wenige Proteine sind exklusive Targets von Pex7

Um mögliche Cargo-Proteine von *UmPex7* zu bestimmen, wurde die *U. maydis* Datenbank nach möglichen PTS2-Proteinen durchsucht. Dafür wurde die Konsensussequenz (Pattern Search: <-x(1,40)-[RK]-[LVIQ]-x(5)-[QH]-[LAF]), die alle bekannten Targets umfasst [143], verwendet. Ursprünglich wurde das PTS2-Motiv durch Analyse der ersten 40 Aminosäuren der Thiolase von Hefe und Ratten abgeleitet [142, 223]. Die Datenbanksuche ergab 122 Treffer, die im Weiteren mittels BLASTP analysiert wurden. Zeigten die möglichen Pex7-Cargos Homologie zu Proteinen, die bekannterweise ihre Funktion außerhalb des Peroxisoms erfüllen, wurden diese aussortiert. Weiterhin wurde die Literatur (Publikationen und Dissertationen) durchsucht und nach demselben Kriterium gefiltert. Laut Kunze *et al.* 2011 zerstören negativ geladene Aminosäuren an Position x2 und geladene Aminosäuren an x3 das peroxisomale Targeting-Signal [144]. Zusätzlich wird die für die Interaktion mit dem Rezeptor

benötigte α -helikale Struktur des PTS2 durch Vorhandensein der Aminosäure Prolin gebrochen [144]. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien blieben 28 Proteine als mögliche Pex7-Targets in *U. maydis* übrig (Tabelle 3, Anhang).

Von den 28 PTS2-Proteinen konnten für elf keine Homologe mit bekannter Funktion gefunden werden, wobei fünf von diesen laut BLASTP nur oder vor allem in *U. maydis* und Verwandten auftreten. Diese könnten beispielsweise für das filamentöse Wachstum und die Pilz-Pflanzen-Interaktion wichtig oder an der Produktion von Sekundärmetaboliten beteiligt sein. Acht von den 28 Proteinen weisen neben dem potentiellen PTS2 weitere Targeting-Signale auf. Es gibt zahlreiche Beispiele für peroxisomale Proteine, die neben den Peroxisomen noch in weiteren Organellen oder im Zytosol lokalisieren [224]. Strukturell sind PTS2-Signale mitochondrialen Targeting-Signalen (mTS) ähnlich [144, 225] und so weisen vier der möglicherweise dual lokalisierenden Proteine ein mTS auf. Fünf der PTS2-Proteine tragen an ihrem C-terminalen Ende ein mögliches PTS1. Darunter die Pyruvat-Carboxylase 2 (Pyc2, Um11593), die laut Vorhersage neben einem PTS2 sowohl ein mTS als auch ein PTS1 aufweist; wobei das PTS1, zumindest als *full-length*-Fusion an GFP, kein peroxisomales Targeting vermittelt (Daten nicht gezeigt). Es wäre spannend, zu überprüfen, ob das an der Gluconeogenese beteiligte Enzym Pyc2 über sein PTS2-Motiv vermittelte peroxisomale Lokalisierung zeigt. Von *U. maydis* ist bekannt, dass auch Enzyme der Glykolyse teilweise im Peroxisom lokalisieren [130]. Für die an der β -Oxidation beteiligten und PTS2-tragenden Enzyme Um00122 und Um11001 [163] konnte in dieser Arbeit über das PTS1 vermitteltes peroxisomales Targeting gezeigt werden (Abbildungen 21 und 22). An der peroxisomalen β -Oxidation ist außerdem das Enzym Um01090 (Pot1) beteiligt, dessen PTS2 als Fusion an GFP funktionell ist und das kein weiteres Targeting-Signal aufweist.

Für die Hefe *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass über den PTS2-Importweg heterooligomere Proteinkomplexe in die Peroxisomen transloziert werden können [139]. Dies lässt sich auch in *U. maydis* nicht ausschließen; folglich könnten auch Proteine ohne PTS2 den Pex7-abhängigen Import ins Peroxisom folgen und die Anzahl der über Pex7 importierten Matrixproteine könnte größer sein als angenommen.

Allerdings werden nicht alle Proteine, die ein PTS2 aufweisen, auch in die peroxisomale Matrix importiert. Zum einen können die das PTS2 umgebenden Aminosäuren die Interaktion von PTS2 an den Rezeptor stören und zum anderen muss dem PTS2 eine flexible bzw. unstrukturierte Region folgen, damit das Targeting-Signal zugänglich für die Interaktion mit seinem Rezeptor ist [144]. Die Linkerregion, die das PTS2 mit dem Core-Protein verbindet, enthält in höheren Eukaryoten eine Schnittstelle für die Prozessierung durch eine Peptidase [144]. In Säugetieren und in Pflanzen wird das PTS2 durch die Matrixpeptidasen Tysnd1 bzw. Deg15 [154, 155, 156] an einer konservierten Cystein-Schnittstelle abgespalten [57, 226, 227]. In niederen Eukaryoten wie Hefen wird das PTS2 nicht prozessiert [156]. Von den in Tabelle 3 (Anhang) aufgelisteten PTS2-Proteinen weist nur Um00092 ein dem PTS2 nachfolgendes Cystein auf, alle anderen 27 Proteine weisen entweder kein Cystein oder erst in großem Abstand nach dem PTS2 auf. Außerdem findet sich mittels BLASTP in *U. maydis* kein Homolog zu Deg15 von *A. thaliana* und Tysnd1 von *H. sapiens*. Dies legt nahe, dass in *U. maydis* das

PTS2 nicht abgespalten wird oder anders als in Säugetieren und Pflanzen prozessiert wird.

Ebenfalls wie in Pflanzen, Metazoa und Pilzen weisen auch in *U. maydis* deutlich mehr peroxisomale Matrixproteine ein PTS1- als ein PTS2-Signal auf. Evolutionär können PTS1- schneller als PTS2-Motive neu generiert werden; außerdem wird im PTS2-Importweg schneller eine Sättigung erreicht, was zusätzlich zur Favorisierung von PTS1 über PTS2 führt [228]. Einige phylogenetisch unverwandte Organismen wie *C. elegans*, *D. melanogaster* und die Kieselalge *P. tricornutum* haben den PTS2-Importweg bereits komplett oder teilweise verloren [91, 92, 93]. Auch in *U. maydis* ist auffällig, dass einige PTS2-Proteine, vor allem solche, die am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind, zusätzlich ein C-terminales peroxisomales Targeting-Signal aufweisen. Auch zeigt die geringe Anzahl möglicher PTS2-Proteine, von denen nur wenige exklusive Targets von Pex7 sind, dass wie in anderen Organismen auch in *U. maydis* der Pex5-abhängige PTS1-Importweg favorisiert.

3.1.4 Für die Verstoffwechselung von Ölsäure ist der PTS2-Importweg nicht essentiell

Die β -Oxidation von Fettsäuren findet in *U. maydis* kooperativ im Peroxisomen und im Mitochondrium statt [163]. Dabei sind Peroxisomen essentiell für die Verstoffwechselung von ungesättigten und langkettigen Fettsäuren, während im Mitochondrium ausschließlich gesättigte kurz- bis mittelkettige Fettsäuren abgebaut werden [163, 170, 171]. Folglich führen Störungen der Peroxisomen unter Fettsäurebedingungen zu einem reduzierten Wachstum [130, 163, 171]. Zusätzlich reichern sich lange und unverstoffwechselte Fettsäuren an, wodurch das Gleichgewicht der Fettsäuren in den Zellmembranen gestört wird und ein Toxizitätseffekt auftritt [197].

In *U. maydis* sind von den möglichen PTS2-Proteinen (Tabelle 3, Anhang) drei Enzyme an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt: Um00122, Um01090 und Um11001 [163]. Für die beiden Enzyme Um00122 und Um11001 konnte in dieser Arbeit peroxisomales Targeting über das C-terminale PTS1 gezeigt werden. Um01090 (Pot1) weist neben dem N-terminalen Targeting-Signal kein weiteres auf und dieses PTS2 ist funktionell und vermittelt peroxisomale Lokalisierung.

Eine Deletion des Rezeptors Pex7 bringt den PTS2-Import zum Erliegen, beeinflusst aber nicht das Wachstum der Zellen auf Ölsäure-haltigen Agarplatten. Folglich ist der Pex7-vermittelte PTS2-Importweg nicht essentiell für den Abbau von Fettsäuren. Das könnte zum einen daran liegen, dass die Enzyme Um00122 und Um11001 über ihr C-terminales Targeting-Signal, und damit unabhängig von Pex7, in die Peroxisomen transportiert werden. Zum anderen weist *U. maydis* neben Um01090 ein weiteres Homolog zu dem *S. cerevisiae* Enzym Fox3 auf [170, 171]; in Hefe und in anderen Organismen ist die peroxisomale Lokalisierung der Thiolase Fox3p essentiell für die Verstoffwechselung von Fettsäuren. In *U. maydis* könnte Um01090 nach Deletion von *pex7* beispielsweise im Komplex mit einem Interaktionspartner oder durch Bindung an die NTD von Pex5 in die Peroxisomen gelangen. Dies könnte aber auch auf die andere 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase Um02715 zutreffen. Dieses Protein weist überraschenderweise weder ein N- noch ein C-terminales peroxisomales Targeting-Signal auf und es ist wahrscheinlich, dass der Import dieses Enzyms in die Peroxisomen entweder über Oligomerisierung mit einem PTS-Protein oder über Interaktion mit Pex5 außerhalb der TPR-Domäne erfolgt.

Zwar ist der PTS2-Importweg in *U. maydis* nicht essentiell für die β -Oxidation von Fettsäuren, könnte aber durchaus eine Rolle unter anderen Bedingungen spielen. Die übrigen 25 möglichen PTS2-Proteine könnten beispielsweise in anderen Stoffwechselwegen oder im filamentösen Wachstum involviert sein.

3.2 Pex5b ist der zentrale Rezeptor im Import peroxisomaler Matrixproteine

3.2.1 Pex5b fungiert als PTS2-Co-Rezeptor

PTS2-Proteine werden im ternären Komplex mit dem PTS2-Rezeptor Pex7 und dem PTS2-Co-Rezeptor an und anschließend über die peroxisomale Membran transportiert [89, 134, 145]. In Hefen und einigen Pilzen fungieren Proteine der Pex20-Familie als PTS2-Co-Rezeptoren, doch *U. maydis* kodiert für keinen der bekannten Vertreter, stattdessen weist die NTD des PTS1-Rezeptor Pex5b Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Pex20-Familie auf [69, 138]. Tatsächlich verblieb das Markerprotein PTS2-GFP nach Einzeldelationen von sowohl *pex7* als auch *pex5b* im Zytosol und re-lokalisierte nach Einbringen der NTD von Pex5b in $\Delta pex5b$ wieder peroxisomal. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *UmPex5b* zusätzlich zu seiner Funktion als PTS1-Rezeptor im PTS2-Importweg eine zentrale Rolle spielt und dafür die NTD des Proteins benötigt wird. Auch in Säugetieren, Pflanzen, einigen Pilzen und primitiven Eukaryoten fungieren Pex5-Proteine als Co-Rezeptoren für Pex7 [58, 59, 60, 61, 62, 136]. Der Basidiomycet *C. neoformans* kodiert ebenfalls wie *U. maydis* für zwei Pex5-Proteine, wovon einer die Rolle des PTS2-Importrezeptors übernehmen könnte [69, 138] (Abbildung 29).

Neben der P7-BD weisen alle PTS2-Co-Rezeptoren di-aromatische Pentapeptide (WxxxF/Y) auf [15, 68, 69, 219], über die die Co-Rezeptoren mit der Docking-Domäne in der peroxisomalen Membran interagieren [109, 149, 150]. Auch in der Aminosäuresequenz von *UmPex5b* finden sich zwei solcher Motive, die teilweise an gleicher Position in Hefen, *C. neoformans*, *A. thaliana* und dem Menschen auftreten (Abbildung 32, Anhang) und über die Pex7, im Komplex mit Pex5b und dem PTS2-Cargo, zur peroxisomalen Membran gebracht werden könnte.

3.2.2 Pex5a und Pex5b sind PTS1-Rezeptoren, aber Pex5a hängt funktionell von Pex5b ab

U. maydis kodiert für zwei Pex5-Rezeptoren, die beide die konservierten Aminosäuren und Motive, die für das Wirken als PTS1-Rezeptor notwendig sind, aufweisen. Dennoch ist Pex5a allein nicht funktionell, sondern kann nur in Anwesenheit der NTD von Pex5b effizient PTS1-Proteine ins Peroxisom transportieren.

Über Speziesgrenzen hinweg weisen Pex5-Proteine nahe ihrem N-terminalen Ende ein konserviertes Cystein und Lysin auf. Nach erfolgreichem Import des Matrixproteins wird Pex5 entweder mono- oder polyubiquitiniert. Die Monoubiquitinierung des Cysteins führt zur Extraktion von Pex5 aus der peroxisomalen Membran [112, 115, 116, 117, 118, 119, 120], während die Polyubiquitinierung des Lysins das Startsignal für die Degradation von Pex5 über das Proteasom ist [70, 116, 120, 124]. Auch in *U. maydis* sind diese Aminosäurereste konserviert: Sowohl Pex5a als auch Pex5b weisen nahe ihrer

N-terminalen Enden ein Cystein wie auch ein Lysin auf (Abbildung 32, Anhang).

Die NTD von Pex5-Proteinen ist relativ unstrukturiert [199] und vermittelt Interaktionen mit anderen Peroxinen, beispielsweise mit Pex14 und Pex13 in der peroxisomalen Membran. Die Bindung an den Docking-Komplex erfolgt über di-aromatische Pentapeptid-Motive in Pex5 [70, 107, 216, 217, 218, 229]. Von den Motiven WxxxF/Y sind die außen liegenden aromatischen Reste in eine Richtung orientiert [55, 108] und können mit zwei hydrophoben Bindetaschen in der NTD von Pex14 [107, 229] oder der SH3-Domäne von Pex13 interagieren [110, 230]. Pex5 von *A. thaliana* weist neun [217] und das menschliche Pex5 sieben dieser Motive auf [216]. Zusätzlich kann HsPex5 noch über ein weiteres Motiv (LVxEF) Pex14 binden, wobei die Bindung mit ähnlicher Affinität aber unterschiedliche Kinetik erfolgt [196]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch das Vorhandensein mehrerer WxxxF/Y-Motive in Pex5 Komplexe höherer Ordnung mit Pex14 gebildet werden können [231]. Pex5p aus *S. cerevisiae* weist zwei WxxxF/Y-Motive auf, die für die Interaktion mit Pex13p essentiell sind, aber nicht für das Docking von Pex5p an Pex14p benötigt werden; für die Pex5p-Pex14p-Interaktion sind zwei weitere Domänen notwendig, wobei eine nicht konserviert und die andere ein revers-orientiertes di-aromatisches Pentapeptid mit der Sequenz FQEVW ist [111, 219, 232]. Dieses Motiv ist hoch-konserviert innerhalb der Pex5-Sequenzen von Pilzen und findet sich auch im Pex5 von *C. elegans* [219].

Sowohl UmPex5a als auch UmPex5b weisen zwei WxxxF/Y- aber kein LVxEF-Motiv auf. Pex5a besitzt zusätzlich eine dem Hefe-Motiv FQEVW ähnliche Sequenz an ähnlicher Stelle (FEDLW, Abbildung 32). Ob jedes der vorhandenen Motive zur Interaktion mit der peroxisomalen Membran beiträgt, kann nicht vorhergesagt werden.

Jedoch co-lokalisierten GFP-Fusionen beider Pex5, auch in Abwesenheit des anderen Pex5, zumindest teilweise mit mCherry-SKL (Daten nicht gezeigt). Diese Stämme verloren über die Zeit das GFP-Signal, wobei mCherry-SKL dann wieder vollständig in den Peroxisomen lokalisierte. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die PTS1-Rezeptoren Pex5a und Pex5b in *U. maydis* getrennt voneinander an die peroxisomale Membran andocken können. In Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass ein großer C-terminaler Tag das Entlassen der Pex5-Proteine über den Extraktionskomplex verhindert [233]. Dies könnte erklären, weshalb die Pex5-Proteine mit GFP-Fusion nicht funktionell waren, obwohl wahrscheinlich sowohl Pex5a als auch Pex5b in *U. maydis* mit dem Docking-Komplex interagieren können.

Die C-terminale Domäne von Pex5-Proteinen ist strukturiert und faltet sich zu einer TPR-Domäne, die Cargos über deren PTS1 bindet. Sowohl Pex5a als auch Pex5b weisen die erwartete Anzahl der Tetratricopeptid-Repeats auf um eine Bindetasche für PTS1-Proteine auszubilden.

Obwohl beide PTS1-Rezeptoren in *U. maydis* die Domänen und Motive für Cargo-Bindung, Docking an die peroxisomale Membran und durch Monoubiquitinierung eingeleitete Extraktion aus der DTM und anschließendes Recycling mitbringen, kommt der Import peroxisomaler Matrixproteine nach Deletion von *pex5b* zum Erliegen. Das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL und alle der getesteten PTS1-Proteine verloren mit *pex5b* auch ihre peroxisomale Lokalisierung, obwohl der Locus von *pex5a*

unverändert blieb. Eine Deletion von *pex5a* hatte dagegen kaum einen Einfluss auf das peroxisomale Targeting von mCherry-SKL und der meisten getesteten PTS1-Proteine. Allerdings zeigten vier der PTS1-Proteine nur im WT peroxisomale Lokalisierung und verbleiben sowohl nach Einzeldelationen von *pex5a* als auch von *pex5b* im Zytosol. Dies ließ vermuten, dass Pex5a sehr wohl als PTS1-Rezeptor fungiert - aber nur in Kombination mit Pex5b. Bei Interaktion der beiden PTS1-Rezeptoren miteinander ist es wahrscheinlich, dass diese über die NTD der beiden Pex5 vermittelt wird. Und tatsächlich zeigten PTS1-Proteine peroxisomales Targeting, wenn Pex5a zusammen mit der NTD von Pex5b exprimiert wurde. In Abwesenheit von Pex5b scheint Pex5a den Importzyklus nicht vollziehen zu können, sondern dafür die Pex5b NTD und damit Pex5b als Co-Rezeptor zu benötigen (Abbildung 29). Dabei werden PTS1-Proteine wahrscheinlich von der TPR-Domäne von Pex5a gebunden und danach Pex5b-abhängig ins Peroxisom transloziert.

In menschlichen Zellen kommen zwei Isoformen von Pex5, Pex5L und Pex5S, vor. Diese beiden Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und die NTDs unterscheiden sich nur in einer 37 Aminosäure-Insertion, die die P7-BD aufweist. Folglich fungiert nur die lange Isoform von *HsPex5* als PTS2-Co-Rezeptor und beide, sowohl Pex5S als auch Pex5L, können PTS1-Proteine importieren [58, 60, 96]. Dabei bilden die Pex5-Proteine Homotetramere und sind nicht aufeinander angewiesen [216]. Auch in *S. cerevisiae* wurde kürzlich ein zweiter PTS1-Rezeptor, Pex9p, charakterisiert. Pex9p erkennt spezifisch Enzyme, die am Glyoxylatzyklus beteiligt sind, und ist auch ohne Pex5p funktionell [128, 129]. Für die Hefe *H. polymorpha* aber konnte gezeigt werden, dass multimeres Pex20p mit einem Pex5p-Tetramer interagieren kann [234]. Die NTD von *UmPex5b* weist Homologien zu Vertretern der Pex20-Familie auf [69, 138] und es ist vorstellbar, dass Pex5a und Pex5b einen heteromeren Komplex bilden. Dabei könnte die Interaktion von Pex5a mit Pex5b, ebenso wie für Pex7 bekannt, über die P7-BD erfolgen. Allerdings ist auffällig, dass Pex5b im Vergleich in der NTD mit zusätzlichen Aminosäuren ausgestattet ist, die Pex5-Proteinen anderer Organismen fehlen (Abbildung 32, Anhang). Auch hierüber könnte die Interaktion der beiden PTS1-Rezeptoren in *U. maydis* erfolgen.

Nicht alle Interaktionen im Import- und Recyclingprozess sind aufgeklärt. In *U. maydis* kann Pex5b den gesamten Zyklus allein durchlaufen, Pex5a ist aber zumindest für einen Schritt bzw. eine Interaktion im In- oder Exportprozess auf Pex5b angewiesen. Beispielsweise ist das für Pex5 und Pex7 in Organismen der Fall, in denen Pex7 in Abhängigkeit von Pex5 und dessen di-aromatischen Pentapeptid-Repeats das Peroxisom betritt. Der Export beider Rezeptoren scheint aber getrennt abzulaufen [151]. Nach dem Export-getriebenen Importmodell ist die Ubiquitin-abhängige Extraktion von Pex5 aus der peroxisomalen Membran an die Translokation der PTS1-Proteine gekoppelt [235]. Demnach könnte der ausbleibende bzw. ineffiziente Import über Pex5a als alleiniger PTS1-Rezeptor auch darauf hindeuten, dass Pex5a Pex5b-abhängig das Peroxisom verlässt. Auch ist möglich, dass ein Zwischenschritt, wie beispielsweise die Insertion in die DTM oder das Loslösen des Cargos von Pex5a die Unterstützung von Pex5b benötigt.

Überraschenderweise war *UmPex5a* in *S. cerevisiae* funktionell und konnte das PTS1-Protein GFP-Sps19p ins Peroxisom importieren. Die Pex5-Proteine von *U. maydis* wurden nach Deletion des hefe-

eigenen *pex5* transient in *S. cerevisiae* exprimiert, wodurch die Menge der PTS1-Rezeptoren auf DNA- und Proteinebene zwischen den Zellen schwankte. Dennoch wurde deutlich, dass die Expression von *UmPex5b* in *S. cerevisiae* in den meisten Zellen zu ausschließlich peroxisomaler Lokalisierung führte, während der von *UmPex5a*-vermittelte Import weniger effizient war, da ein Anteil von GFP-Sps19p im Zytosol verblieb. Für *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Pex18p die NTD von Pex5p ersetzen kann [140]. Deshalb stellte sich die Frage, ob *UmPex5a* in $\Delta pex5$ funktionell war, weil dieser Stamm endogen *pex18* exprimiert. Doch auch nach Deletion der PTS2-Co-Rezeptoren, sowohl *pex18* als auch *pex21*, konnte *UmPex5a* weiterhin das peroxisomale Matrixprotein GFP-Sps19p, zumindest teilweise, über die peroxisomale Membran transferieren. An der Funktionalität von *UmPex5a* in *S. cerevisiae* änderte auch eine Deletion des Pex5-ähnlichen Proteins Pex9p nichts.

Jedoch brachte eine Deletion von *pex8* den PTS1-Import, vermittelt über *UmPex5a* oder *UmPex5b*, in Bäckerhefe zum Erliegen. In *S. cerevisiae* bringt Pex8p den Docking- und RING-Komplex zusammen und ist damit maßgeblich an der Translokation der PTS1-Proteine beteiligt [38]; in einem *pex8*-Deletionsstamm findet kein Import von Matrixproteinen mehr statt [204]. In *U. maydis* gibt es ein mögliches Pex8 [138, 163], von dem bisher aber nicht nachgewiesen werden konnte, dass es sich bei diesem tatsächlich um ein Homolog handelt (Bachelorarbeit Laura Guttendörfer). Es ist wahrscheinlich, dass der fehlende Import über *UmPex5a* und *UmPex5b* in $\Delta pex8$ nur die Folge davon ist, dass die beiden für den Import notwendigen Komplexe nicht mehr über Pex8p miteinander agieren. In der Hefe *P. pastoris* wird der Docking- mit dem RING-Komplex über Pex3p zusammengebracht [236] und es wäre spannend zu wissen, ob es ein Pex8-Homolog in *U. maydis* gibt oder ob, wie in *P. pastoris*, Pex3 dessen Rolle einnimmt.

Zu beachten ist, dass die Peroxisomen in *S. cerevisiae* eine weniger prominente Rolle als in *U. maydis* einnehmen. So vergrößert sich die Anzahl der Peroxisomen unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise wenn Fettsäuren als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen; unter Standardkulturbedingungen im Labor weist eine Hefezelle aber nur ein bis vier Peroxisomen auf [237]. Die *UmPex5a*- und *UmPex5b*-exprimierenden Hefezellen wurden unter Glukosebedingungen angezogen. Es ist möglich, dass nach Expression von *UmPex5a* punktförmige Lokalisierung - neben einem ebenfalls starken zytosolischem GFP-Signal - sichtbar war, weil sich das PTS1-Protein GFP-Sps19p nur auf eine sehr geringe Anzahl Peroxisomen pro Zelle konzentrierte. Vereinzelt waren auch in *U. maydis* $\Delta pex5b$ -Zellen Punkte sichtbar, die $\Delta pex19$ - und $\Delta pex3$ -Stämme nicht aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass Pex5a ohne die NTD von Pex5b sowohl in *S. cerevisiae* als auch *U. maydis* mit schwacher Effizienz wirkt und das Fluoreszenzsignal markierter und peroxisomal lokalisierender PTS1-Proteine in *U. maydis* aufgrund der hohen Anzahl an Peroxisomen vom zytosolischen Signal überstrahlt wird.

Die Experimente in *S. cerevisiae* bestätigen, dass *UmPex5b* allein als PTS1 Importrezeptor funktionell ist, und zeigen, dass Pex18p und Pex21p nicht die Rolle der NTD von *UmPex5b* als „Pex5a-Helfer“ einnehmen können. Das kann entweder daran liegen, dass die Proteine aus unterschiedlichen Organismen stammen und Unterschiede in der P7-BD aufweisen oder dass die für das Funktionieren von

Pex5a benötigte Domäne in der NTD von Pex5b nicht in den PTS2-Co-Rezeptoren Pex18p und Pex21p vorkommt.

Zwar weisen die Experimente keine direkte Interaktion zwischen Pex5a und Pex5b nach, aber da aus anderen Organismen bekannt ist, dass eine PTS1-Importpore aus mehreren Pex5-Proteinen besteht, liegt die Vermutung nahe, dass Pex5a und Pex5b als Heterokomplex das Peroxisom entweder betreten oder verlassen (Abbildung 29).

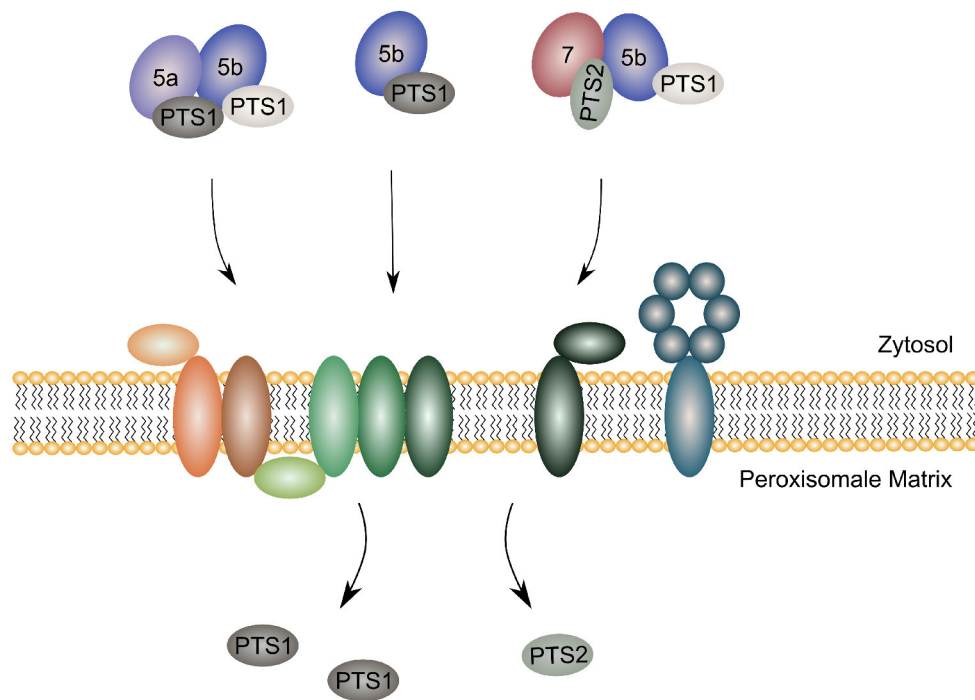


Abbildung 29: Import peroxisomaler Matrixproteine in *U. maydis*

In *U. maydis* gibt es zwei PTS1-Rezeptoren, Pex5a und Pex5b (violett), die beide PTS1-Proteine (dunkelgrau) aus dem Zytosol ins Peroxisom translozieren können. Dabei ist Pex5b als alleiniger Importrezeptor funktionell, während Pex5a nur in Anwesenheit von Pex5b Proteine ins Peroxisom transportieren kann. Dabei interagieren die Proteine Pex5a und Pex5b wahrscheinlich miteinander. Auch der PTS2-Importweg benötigt Pex5b als Co-Rezeptor, wobei aus anderen Organismen bekannt ist, dass Pex7 (rot), das PTS2-Protein (grau) und der PTS2-Co-Rezeptor einen trimären Komplex bilden. Ob Pex5b als Co-Rezeptor im PTS1-Importweg mit Pex5a oder im PTS2-Importweg mit Pex7 auch ein PTS1-Protein gebunden hat, ist nicht bekannt (hellgrau).

3.3 Die PTS1-Importrezeptoren erkennen teilweise unterschiedliche Cargos

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Pex5a als auch Pex5b von *U. maydis* PTS1-Proteine erkennen und importieren können. Dabei ist Pex5a nur in Anwesenheit der NTD von Pex5b funktionell, während Pex5b auch allein als PTS1-Rezeptor fungiert. Als einige GFP-PTS1-Proteine in $\Delta pex5b$ -Zellen keinerlei und in $\Delta pex5a$ -Stämmen eingeschränktes oder ebenfalls kein Targeting mehr zeigten, ließ dies die Vermutung zu, dass die PTS1-Motive dieser Proteine bevorzugt von Pex5a importiert werden und dass sich die beiden Pex5-Proteine in *U. maydis* in ihrer Cargo-Spezifität unterscheiden.

3.3.1 Das peroxisomale Targeting einiger PTS1-Proteine hängt von der TPR-Domäne von Pex5a ab

Die GFP-Fusionen mit den PTS1 der Proteine Pgk1 und 2 des Menschen, Gapdh2 von *P. blakesleeanus* und Shy1 (Um05230) lokalisierten weder in $\Delta pex5b$ noch in $\Delta pex5a$ peroxisomal, obwohl sie im WT durchaus peroxisomales Targeting zeigten. Diese vier möglicherweise Pex5a-abhängigen PTS1-Proteine wurden auch in *S. cerevisiae* exprimiert, wobei nur eines in die Peroxisomen transportiert wurde und die anderen drei RFP-PTS1-Proteine im Zytosol verblieben. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass *U. maydis* Pex5-Proteine andere PTS1 erkennen als die PTS1-Rezeptoren Pex5p und Pex9p aus *S. cerevisiae*.

Dabei ist anzumerken, dass die getesteten PTS1 der Pgk1 und 2 aus *H. sapiens* und Gapdh2 aus *P. blakesleeanus* wahrscheinlich auch peroxisomale Lokalisierung dieser Proteine in den Organismen, aus denen sie stammen, vermitteln [130]. Von der Salicylathydroxylase (Shy1) aus *U. maydis* jedoch ist eine zytosolische Lokalisierung publiziert [207]. Eine Fusion des *full-length*-Proteins an GFP und die Expression in *U. maydis*-Zellen bestätigte dies, da GFP-Shy1 im Zytosol verblieb. Nicht alle Proteine, die ein PTS1 an ihrem C-terminalen Ende aufweisen, sind auch peroxisomale Matrixproteine, denn für die Erkennung durch einem PTS1-Rezeptor muss der C-Terminus zugänglich sein; dadurch, dass die Erkennungsregion partiell ungefaltet ist und das Protein vor dem PTS1 eine Linker-Region aufweist [105, 238]. Das C-terminale Ende von Shy1 könnte zum einen nicht nach außen präsentiert werden oder die Aminosäuren, die vor dem PTS1 liegen, stören die Interaktion mit dem PTS1-Rezeptor.

Um herauszufinden, ob die Pex5a-Abhängigkeit über die TPR-Domäne dieses PTS1-Rezeptors vermittelt wird, wurden chimäre Pex5-Proteine generiert. Dabei wurden die strukturierten C-terminalen Domänen beider Pex5-Proteine jeweils an den *pex5*-Loki gegeneinander ausgetauscht, wonach Pex5-Chimären unter den endogenen *pex5*-Promotern exprimiert wurden.

In diesen Pex5-Chimären wurden die Proteine GFP-PTS1_{Shy1} und GFP-PTS1_{Gapdh2Pb} exprimiert. Im Vergleich zum WT verschlechterte sich das peroxisomale Targeting dieser beiden PTS1-Proteine nach Deletion der TPR-Domäne von Pex5b (*pex5b* Δ TPR). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass ein kleiner Anteil der PTS1-Proteine möglicherweise über die TPR-Domäne von Pex5b in die Peroxisomen transportiert wird. Andererseits könnte auch die Pex5b-Verkürzung weniger effizient funktionieren als die *full-length*-Variante dieses Proteins. Genau dies konnte für den PTS2-Import beobachtet werden, da die Expression der NTD von Pex5b nach Deletion von *pex5b* zwar zur peroxisomalen Re-Lokalisierung von PTS2-GFP führte, aber mit schlechterer Effizienz als im WT. Die GFP-PTS1-Proteine lokalisierten peroxisomal, wenn die TPR-Domäne von Pex5b gegen die von Pex5a ausgetauscht wurde (*pex5b*:TPR_{*pex5a*}). Dies könnte zum einen darauf hindeuten, dass das chimäre Protein stabiler ist als die Pex5b-Verkürzung, zum anderen spricht es dafür, dass die beiden GFP-PTS1-Proteine vorwiegend von Pex5a erkannt werden. In Übereinstimmung verblieb ein großer Anteil der PTS1-Proteine im Zytosol, wenn keine TPR-Domäne von Pex5a (*pex5a*:TPR_{*pex5b*}) exprimiert wurde. Da in der Mutante $\Delta pex5a$ *pex5b* Δ TPR keinerlei peroxisomales GFP-Signal sichtbar war, werden diese PTS1-Proteine nicht TPR-unabhängig von Pex5b in die Peroxisomen transportiert. Während

sich die intrazelluläre Lokalisierung von GFP-PTS1_{GapdhPb} und GFP-PTS1_{Shy1} in den verschiedenen Mutanten unterschied, zeigte mCherry-SKL immer ausschließlich peroxisomale Lokalisation, solange zumindest ein funktionelles Pex5-Protein vorhanden war. Das bedeutet, dass es PTS1-Proteine gibt, die bevorzugt von einem Pex5 erkannt werden, und solche, die von Pex5a und Pex5b gleichermaßen in die Peroxisomen importiert werden.

3.3.2 Auch die NTD von Pex5a ist an der Bindung einiger Cargos beteiligt

Die vier Pex5a-abhängigen GFP-PTS1-Proteine stammten entweder nicht aus *U. maydis* oder zeigten als *full-length*-Protein kein peroxisomales Targeting. Um festzustellen, ob es auch *U. maydis*-eigene Proteine gibt, die bevorzugt von Pex5a erkannt werden, sollten PTS1-Proteine aus diesem Pilz getestet werden. Da Pex5a für das Wachstum auf Ölsäure benötigt wird [130] und eine Deletion dieses PTS1-Rezeptors nicht von Pex5b komplementiert werden kann, stand die Vermutung im Raum, dass die PTS1 einiger Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation bevorzugt von Pex5a importiert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die letzten zwölf Aminosäuren dieser Proteine an GFP fusioniert und in die intrazelluläre Lokalisierung im WT und in $\Delta pex5a$ überprüft. Dreizehn dieser GFP-PTS1-Fusionen zeigten sowohl im WT als auch in der Deletionsmutante ausschließlich peroxisomale Lokalisierung, während drei GFP-PTS1-Fusionen der getesteten β -Oxidationsenzyme in $\Delta pex5a$ zumindest teilweise im Zytosol verblieben. Das peroxisomale Targeting dieser Enzyme verschlechterte sich in der Deletionsmutante auch im Falle der *full-length*-Proteine. Da sowohl die Proteinfusionen als auch die GFP-PTS1-Fusionen schlechteres Targeting in $\Delta pex5a$ aufweisen, spricht das dafür, dass Um01966, Um10665 und Um11001 Pex5a-abhängig ins Peroxisom importiert werden und dass der Import über das PTS1 dieser Enzyme vermittelt wird.

Zur Überprüfung der PTS1-vermittelten Pex5a-Abhängigkeit dieser β -Oxidationsenzyme wurden im WT und in $\Delta pex5a$ -Zellen die Proteine mit optimiertem PTS1 exprimiert. Dafür wurden hinter das protein-eigene PTS1 zwölf weitere Aminosäuren fusioniert, die das peroxisomale Targeting laut PTS1-Predictor [105, 106] drastisch verbessern. Jenes PTS1 weist auch das Protein mCherry-SKL auf, welches gleichermaßen von Pex5a und Pex5b ins Peroxisom importiert wurde. Die Proteine Um01966, Um10665 und 11001 lokalisierten im WT und in $\Delta pex5a$ ausschließlich peroxisomal, konnten also allein von Pex5b in die Peroxisomen importiert werden und verloren mit dem optimierten PTS1 ihre Pex5a-Abhängigkeit, wodurch die zuvor gemachte Vermutung gestützt wird.

Um zu untersuchen, ob die PTS1-vermittelte Pex5a-Abhängigkeit von der TPR-Domäne dieses PTS1-Rezeptors abhängt, wurden die GFP-Fusionen der Enzyme Um01966, Um10665 und Um11001 in Pex5-Chimären exprimiert. Dabei zeigte GFP-Um11001 in allen Mutanten peroxisomale Lokalisierung, unabhängig davon, ob die TPR-Domäne von Pex5a oder Pex5b zur Verfügung stand. Um11001 weist neben seinem PTS1 noch ein PTS2 auf und in *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass PTS2-Proteine trotz N-terminalem GFP-Tag weiterhin über Pex7p in die Peroxisomen transloziert werden können [239]. Dies jedoch ist für GFP-Um11001 ausgeschlossen, da dieses Protein in $\Delta pex5a$ als auch mit maskiertem PTS1 im Zytosol verblieb. Auffällig ist, dass GFP-Um11001 in dem Stamm

ohne TPR-Domäne von Pex5a (*pex5a:TPR_{pex5b}*) besseres peroxisomales Targeting aufweist als in Δ *pex5a*. Die peroxisomale Lokalisierung dieses Proteins wird folglich nicht ausschließlich von dessen PTS1 und der TPR-Domäne von Pex5a vermittelt, sondern die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Bindung von Um11001 an Pex5a durch eine Interaktion außerhalb des PTS1 und innerhalb der NTD von Pex5a verstärkt wird. Die unterstützende Funktion der NTD von Pex5a ist aber nicht ausreichend um Um11001 ohne funktionelles PTS1 in die Peroxisomen zu importieren, da die Proteinvariante mit dem maskierten PTS1-Motiv im Zytosol verblieb. Das Prinzip der zusätzlichen Bindestelle ist beispielsweise für die Katalase der Säugetiere bekannt: In diesen Zellen interagiert das peroxisomale Matrixprotein neben der PTS1-TPR-Bindung über eine internes PTS mit der NTD von Pex5 [63]. Vorstellbar ist dies auch für das β -Oxidationsenzym Um10665, da dies nur bei Expression von Pex5a in seiner WT-Variante ausschließlich peroxisomales Targeting zeigte und dieses sich verschlechterte, wenn die NTD von Pex5a (Δ *pex5a pex5b:TPR_{pex5a}*) deletiert war. Doch auch für Um10665 ist die mögliche zusätzliche Interaktion mit der NTD von Pex5a nicht ausreichend für peroxisomalen Import, da das Protein mit maskiertem PTS1 im Zytosol verblieb. Im Gleichklang zu den anderen beiden Enzymen lokalisierte auch Um01966 ausschließlich peroxisomal, wenn die NTD von Pex5a in den Zellen exprimiert wurde; für dieses Protein aber unabhängig von der fusionierten TPR-Domäne. Zusätzlich wurde dieses Protein mit geringerer Effizienz in die Peroxisomen importiert, wenn von Pex5a nur die C-terminale Domäne vorhanden war und die NTD fehlte (Δ *pex5a pex5b:TPR_{pex5a}*). Um01966 scheint ebenfalls für effizienten peroxisomalen Import beide Domäne von Pex5a zu benötigen.

Überraschenderweise zeigte Um01966 auch dann noch peroxisomale Lokalisierung, wenn dessen PTS1 maskiert war. Eine mögliche Interpretation ist, dass eine Interaktion dieses Enzyms mit der NTD von Pex5a ausreichend für peroxisomalen Import ist. Dieser Mechanismus ist beispielsweise für Pex20 aus *P. anserina* bekannt, das ohne Pex5p oder Pex7p durch direkte Bindung der Cargos diese in die peroxisomale Matrix transportieren kann [240]. Auch in Hefen interagieren Proteine mit der NTD von Pex5p, wie Acyl-CoA-Oxidase in *S. cerevisiae* [66] und eine Alkoholoxidase in *H. polymorpha* [65]. Andererseits schließen die Ergebnisse einen Piggy back-Mechanismus für Um01966 nicht aus. Das β -Oxidationsenzym könnte dabei mit dem endogen exprimierten Um01966 interagieren oder mit einem weiteren Protein ein Heterooligomer bilden. In diesem Fall könnte sogar der Interaktionspartner ein Pex5a-spezifisches Protein sein und die beobachteten Lokalisierungen von GFP-Um01966 in den Pex5-Chimären nur ein sekundärer Effekt sein. In der Literatur finden sich für Acyl-CoA-Oxidase sowohl welche, die im Komplex [169], als auch solche, die bevorzugt als Monomer importiert werden [241]. Ob Um01966 in Abhängigkeit der NTD von Pex5a in die peroxisomale Matrix gelangt, könnte beispielsweise durch Deletion von *pex5b* und der TPR-Domäne von Pex5a oder durch Expression der NTD in einem Doppeldeletionsstamm für *pex5a/pex5b* geklärt werden.

3.3.3 Die TPR-Domänen von *U. maydis* Pex5a und Pex5b und von *S. cerevisiae* Pex5p unterscheiden sich nicht in konservierten Aminosäuren

Pex5a-abhängige Proteine könnten ihre Rezeptor-Spezifität über zwei verschiedene Wege erlangen. Zum einen könnten die Pex5a-spezifischen Proteine neben der PTS1-Bindetasche mit der NTD von Pex5a interagieren und zum anderen könnte die Bevorzugung eines Pex5-Proteins auch über das PTS1 vermittelt werden. PTS1 werden von der TPR-Domäne gebunden, wobei konservierte Aminosäurereste der TPR-Domäne mit dem C-terminalen Ende des Cargo-Proteins interagieren [15, 108, 114]. Mutationen dieser konservierten Aminosäuren führen zu Importdefekten peroxisomaler Matrixproteine *in vivo* [242]. Die Auswertung von Kristallstrukturen von Pex5 mit unterschiedlichen Cargos führte zum *induced fit*-Modell. Demnach wird das PTS1 von den TPR1-3 und TPR5-7 gebunden und die Position und Größe der Bindetasche kann über die TPR4 reguliert werden. Dieser Mechanismus erklärt, weshalb eine Vielzahl von PTS1-Motiven von derselben TPR-Domäne gebunden werden kann [200, 211].

Ein Vergleich der Sequenzen von Pex5-Proteinen verschiedener Organismen mit denen von *U. maydis* zeigte, dass diese konservierten Reste auch in diesem Pilz nicht abweichen (Abbildung 32, Anhang). *U. maydis* Pex5a und Pex5b unterscheiden sich in einer konservierten Aminosäure von *H. sapiens* und anderen Organismen, teilen diese aber mit Pex5p der Hefe *S. cerevisiae*. Dennoch erkennen sowohl die PTS1-Rezeptoren von *S. cerevisiae* als auch die beiden Pex5 von *U. maydis* unterschiedliche PTS1-Motive. Möglich ist, dass weitere Aminosäurereste der TPR-Domäne mit dem PTS1 interagieren können, vor allem, wenn es ein unkonventionelles PTS1 ist, das in zumindest einer Aminosäure von der Konsensussequenz des Tripeptids abweicht. Pex5p von *S. cerevisiae* und Pex5a und Pex5b aus *U. maydis* unterscheiden sich untereinander in einigen Aminosäuren innerhalb ihrer TPR-Domänen (Abbildung 32, Anhang). Die TPR1 von Pex5a weicht sogar so von der TPR-Konsensussequenz ab, dass diese nicht von dem Tool TPRpred [193, 194] erkannt wurde.

Neben dem C-terminalen Tripeptid des PTS1-Proteins tragen auch die davor liegenden Aminosäuren zur Spezifität bei [98, 104, 243]. Co-Kristallisationen der menschlichen Pex5 TPR-Domäne mit einem PTS1-Peptid und bioinformatische Analysen zeigten, dass diese Aminosäurereste im Kontakt mit den Oberflächenresten des Rezeptors stehen [57, 64, 105, 106, 238, 244]. Aus bioinformatischen Studien des peroxisomalen Proteoms von *A. thaliana* ist bekannt, welche Aminosäuren an welcher Position innerhalb des PTS1 einen fördernden oder störenden Effekt auf die Interaktion mit Pex5 haben. Förderlich für die Pex5-PTS1-Interaktion sind große, hydrophobe Aminosäurereste (Leucin, Methionin) an Position -1, positiv geladene Reste (Lysin, Arginin, Histidin) an Position -2, kleine Reste (Serin, Alanin, Cystein) an Position -3 und basische Reste (Histidin, Lysin, Arginin) vor dem PTS1 (-4 bis -6). Dagegen wird die Interaktion von sauren Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) in unmittelbarer Nähe zum PTS1 (-4 bis -6) gestört [57, 245].

Vergleicht man die in dieser Arbeit getesteten PTS1 miteinander, fällt auf, dass die drei PTS1, die in *U. maydis* über Pex5a, aber nicht in *S. cerevisiae* peroxisomales Targeting des fusionierten Fluorophors vermittelten (PTS1 von Pgk1 und 2 aus *H. sapiens* und Gapdh2 aus *P. blakesleeanus*), in ein

Tabelle 2: **Fördernde und störende Aminosäurereste in getesteten PTS1.**

In Pflanzen fördern große, hydrophobe Reste an Position -1 (L, M), positiv geladene an Position -2 (K, R, H), kleine an Position -3 (S, A, C) und basische an den Positionen -4 bis -6 (H, K, R) die Interaktion des PTS1 mit Pex5. Dagegen stören saure Reste an den Positionen -4 bis -6 (D, E) [57, 245]. Diese **begünstigenden** und die **störenden** Aminosäurereste sind in den in *U. maydis* getesteten PTS1 markiert. Einfach unterstrichen sind jene Gene, deren Proteinprodukte als GFP-PTS1-Fusion in $\Delta pex5a$ schwächeres peroxisomales Targeting zeigten als im WT. GFP-PTS1, die nach Deletion von *pex5a* keine peroxisomale Lokalisierung mehr zeigten, sind doppelt unterstrichen. Die mit Sternchen* versehen PTS1-Motive zeigten als Fusion an GFP bereits im WT sowohl peroxisomale als auch zytosolische Lokalisierung *U. maydis*-Zellen. PTS1-Motive, versehen mit zwei Sternchen**, zeigten in der $\Delta pex5a$ -Mutante peroxisomales und zytosolisches GFP-Signal, wobei diese Signale nicht im WT getestet wurden. Die Abkürzungen für die Organismen sind A.n., *Aspergillus nidulans*, B.c., *Botrytis cinerea*, C.a., *Candida albicans*, H.s., *Homo sapiens*, P.b., *Phycomyces blakesleeanus*, P.m., *Penicillium marneffe*.

Gen	PTS1	Gen	PTS1
<i>um00122</i>	WTQSG D V K SHL*	<i>um06400</i>	ALLAKAGI K SHL*
<i>um00589</i>	ELKNGG H V K ANI*	<i>um06507</i>	PISVPVGL P SKL*
<i>um01329 (idh1)*</i>	THEFTQAVL S NL*	<i>um10273</i>	VMQKQTP K F A KL*
<i>um01438 (mac3)</i>	TIIVQCC H I A SL*	<i>um10538</i>	KREDQN E A K ANL*
<i>um01466</i>	QALRMMP E N A RL*	<i>um10665</i>	QQLKLVG P Q S KF*
<i>um01540</i>	THTAEL T RRANL*	<i>um10797**</i>	SQIKQHS E RPNL*
<i>um01599</i>	FENIAAGAR H KL*	<i>um10825</i>	IRLDGASRL G KL*
<i>um01747</i>	VANDDVAR F AKL*	<i>um11001</i>	EADRARS R ASNL*
<i>um01850</i>	NEVKKMS R VAKL*	<i>um11161 (mdh1)</i>	NISKGVQFTANL*
<i>um01966</i>	PMLKAAA E RSNL*	<i>um11938</i>	LDGVL K SQ K AKL*
<i>um02028</i>	GEAVPFT E RA R AL*	<i>um11953</i>	AALEDG E PKANL*
<i>um02097</i>	LAPPSS H ARSKL*	<i>gapd (A.n.)</i>	ETGRKPMAR S SL*
<i>um02208</i>	TDFDSDL P RAKL*	<i>gapd (B.c.)*</i>	VELKPN A HPQKL*
<i>um03158</i>	ESLRAAAA K SKL*	<i>gapd (C.a.)</i>	VAKASASS K TRL*
<i>um03299 (tpi1)*</i>	ANASLAGQS A RI*	<i>pgk1 (H.s.)</i>	KVLPGV D ALSNI*
<i>um04744**</i>	QACILRP H AHNL*	<i>pgk2 (H.s.)</i>	KILPGV E ALSNM*
<i>um05230 (shy1)</i>	NDQMNQW I QQNL*	<i>gapd2 (P.b.)</i>	LLVHVAK V DGNL*
<i>um06153</i>	TLPQLSS P RA N L*	<i>pgk (P.m.)*</i>	VSALS K SV S SL*

oder zwei Aminosäuren dem Konsensus des Tripeptids entsprechen und in unmittelbarer Nähe zum PTS1 störende Aminosäuren aufweisen (Tabelle 2). Die drei PTS1 aus *U. maydis*, die in einer Deletionsmutante für *pex5a* schlechteres peroxisomales Targeting zeigten als im WT (PTS1 von Um01966, Um10665 und Um11001), haben gemeinsam, dass das Tripeptid nur in zwei von drei Stellen der Konsensussequenz entspricht. Tatsächlich scheint dies eine Gemeinsamkeit von PTS1-Motiven zu sein, die in $\Delta pex5a$ -Zellen als Fusion an GFP sowohl im Zytosol als auch in den Peroxisomen lokalisieren (Tabelle 2). Nicht von all den in Tabelle 2 gelisteten GFP-PTS1-Proteinen wurde die intrazelluläre Lokalisierung auch in WT-Zellen überprüft. Deshalb lässt sich an dieser Stelle nur schlussfolgern, dass PTS1-Proteine mit geringerer Effizienz in die Peroxisomen importiert werden, wenn zumindest eine Aminosäure des C-terminalen Tripeptids vom Konsensus abweicht und wenn unmittelbar vor dem PTS1 maximal ein die Interaktion mit Pex5 fördernder und unter Umständen noch ein störender Aminosäurerest auftritt. Außerdem legen die Ergebnisse der in *U. maydis* getesteten PTS1-Motive

aus anderen Organismen nahe, dass Pex5a toleranter als Pex5b gegenüber störender Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zum PTS1 zu sein scheint.

Pex5-Proteine weisen nach der TPR7 weitere Aminosäuren auf, den sogenannten „7C-Loop“, der die TPR7 mit dem C-terminalen Bündel verbindet. Der 7C-Loop interagiert nach Bindung des PTS1-Cargos mit der TPR1 und verschließt so die Bindetasche, wodurch dieser Loop eine sekundäre Bindestelle sein könnte [246]. Die Kristallstrukturen von Pex5 zusammen mit dem Sterol-Carrier-Protein (SCP2) als auch der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) zeigen zusätzliche Kontaktstellen zwischen dem Cargo und dem 7C-Loop als auch dem C-terminalen Bündel von Pex5 [114, 210, 211]. Das Targeting der AGT erfolgt über zwei Signale [247], ein C-terminales KKKL-Motiv und eine interne, 8 Aminosäuren lange Sequenz, die außerhalb des PTS1 und auf der Oberfläche des Proteins liegt [248]. Tatsächlich führten Punktmutationen in den der TPR7 nachfolgenden Aminosäuren in Pex5 des Menschen zu vermindertem Targeting von PTS1-Proteinen [114]. Es ist vorstellbar, dass auch in anderen Organismen über den 7C-Loop und das C-terminale Bündel eine Diskriminierung von Cargo-Proteinen erfolgt. Dies wäre durchaus eine mögliche Erklärung, weshalb Pex5p von *S. cerevisiae* und beide Pex5-Proteine aus *U. maydis* verschiedene Cargos mit unterschiedlicher Effizienz ins Peroxisom importieren.

Es ist wahrscheinlich, dass die Enzyme Um10665 und Um11001 und möglicherweise auch Um01966 zuerst von der TPR-Domäne des PTS1-Rezeptors gebunden werden, wobei die GFP-PTS1-Fusionen dieser drei Enzyme nur effektiv in die Peroxisomen transportiert wurden, wenn Pex5a vorhanden war. Da sich die TPR-Domänen von Pex5a und Pex5b nicht in den konservierten Aminosäuren unterscheiden, könnte die Bevorzugung der TPR-Domäne eines PTS1-Rezeptors daher rühren, dass das Bündel am C-terminalen Ende der Importrezeptoren variiert und dies zusätzlich mit dem PTS1-Protein interagiert. Zusätzlich ist es vorstellbar, dass die Interaktion zwischen Pex5a und seinem spezifischen Cargo durch zumindest eine zusätzliche Interaktion verstärkt wird, die von einer Stelle innerhalb der NTD von Pex5a und der Proteinoberfläche des Cargos vermittelt wird.

3.4 *U. maydis* PTS1-Rezeptoren und ihre Rolle in der peroxisomalen β -Oxidation

Wie auch Säugetierzellen weist der Basidiomycet *U. maydis* ein komplettes Set an Enzymen für die mitochondriale und die peroxisomale β -Oxidation auf [163]. Dabei werden im Peroxisom lang- und verzweigtkettige und ungesättigte Fettsäuren abgebaut, während im Mitochondrium kurz- und mittelkettige Fettsäuren verstoffwechselt werden [163, 170, 171]. Aus diesem Grund werden für das Wachstum von *U. maydis* unter Bedingungen, bei denen die langen und ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (C18:1) oder Linolsäure (C18:2) oder die lange Fettsäure Myristinsäure (C14) als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen, die Peroxisomen benötigt. Peroxisomale Defekte, wie Störungen im peroxisomalen Import von Matrixproteinen, schränken das Wachstum von *U. maydis* unter diesen Wachstumsbedingungen ein [130, 163, 170, 171]. Neben einer gestörten peroxisomalen β -Oxidation sind die Zellen als Folge dem Einfluss der Anreicherung von langen und ungesättigten Fettsäuren ausgesetzt, die durch ein Ungleichgewicht der Fettsäuren in Zellmembranen zu Änderungen der bio-

physikalischen Eigenschaften dieser führen [197].

Die Deletionsmutante für *pex5b* zeigt denselben Phänotyp wie die peroxisomen-losen Mutanten $\Delta pex19$ und $\Delta pex3$. Alle drei Stämme waren nicht in der Lage, Ölsäure zu verstoffwechseln und zeigten keinerlei peroxisomales Targeting des PTS1-Proteins mCherry-SKL. Daraus lässt sich folgern, dass Pex5b genauso essentiell für das Funktionieren der Peroxisomen ist wie die an der Biogenese beteiligten Peroxine Pex3 und Pex19. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit kein Protein gefunden werden, das nach Deletion von *pex5b* noch in die peroxisomale Matrix importiert wird. Es ist vorstellbar, dass in $\Delta pex5b$ -Stämmen Prä-Peroxisomen gebildet werden, die durch Ermangelung peroxisomalen Matrixproteinimports leer bleiben. Man kennt sogenannte „Ghosts“ beispielsweise aus Säugetierzellen mit *pex5*-Deletion oder Patienten mit Zellweger-Syndrom [249, 250, 251]. Auch könnten die peroxisomalen Ghosts durch Pexophagie abgebaut werden [252, 253]. Dafür, dass diese Ghosts zumindest für eine gewisse Zeit in *U. maydis*-Zellen verbleiben, spricht, dass GFP-fusioniertes Pex12 in $\Delta pex5b$ -Stämmen punktförmig innerhalb der Zellen lokalisierte (Daten nicht gezeigt).

Eine Deletion des anderen *U. maydis* PTS1-Rezeptors *pex5a* führte ebenfalls zu einem reduzierten Wachstum unter Fettsäurebedingungen, aber dieser Stamm zeigte im Gegensatz zu den peroxisomen-losen Mutanten ein residuales Wachstum. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pex5b ohne Pex5a als PTS1-Rezeptor funktionell ist, aber dennoch scheint Pex5b allein für die peroxisomale β -Oxidation nicht ausreichend zu sein. Die Wichtigkeit der Anwesenheit beider Pex5 wird dadurch unterstrichen, dass die beiden PTS1-Rezeptoren in *U. maydis* unter Fettsäurebedingungen nicht gegeneinander austauschbar sind.

Die Bedeutung von Pex5b erklärt sich dadurch, dass ohne dieses Protein keinerlei peroxisomaler Import stattfindet, auch nicht über Pex5a, dessen Funktionalität von Pex5b abhängig ist. Zusätzlich ist die TPR-Domäne von Pex5b essentiell für die Metabolisierung von Fettsäuren. So zeigten die Stämme *pex5b* Δ TPR und *pex5b*:TPR_{*pex5a*} ein reduziertes, aber untereinander vergleichbares Wachstum unter diesen Bedingungen. Beiden Stämmen ist gemein, dass ihnen die TPR-Domäne und damit die PTS1-Bindetasche von Pex5b fehlt. Dies spricht dafür, dass es Pex5b-abhängige Cargos gibt. Welche PTS1-Proteine von der Pex5 TPR-Domäne erkannt werden, könnte man durch intrazelluläre Lokalisationsuntersuchungen verschiedener PTS1-Proteine herausfinden. Dafür könnte das Targeting der peroxisomalen Matrixproteine vergleichend in den Stämmen $\Delta pex5a$ und *pex5b* Δ TPR untersucht werden.

Im Gegensatz dazu kann die TPR-Domäne von Pex5a gegen die von Pex5b getauscht werden, ohne das Wachstum der Zellen unter Fettsäurebedingungen einzuschränken. Dies ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen zu den β -Oxidationsenzymen Um01966, Um10665 und Um11001. Zwar hängt die Lokalisierung dieser Proteine von Pex5a ab, aber die Optimierung des PTS1, wodurch sie effektiv von Pex5b in die Peroxisomen transportiert werden konnten, führte nicht zu einem verbesserten Wachstum auf Fettsäuren.

Es ist viel wahrscheinlicher, dass die NTD von Pex5a der Teil des Proteins ist, dessen Fehlen den Wachstumsdefekt der Zellen unter Fettsäurebedingungen hervorruft. Während die Expression von

pex5b unter dem *pex5a*-Promoter nicht den Phänotyp von $\Delta pex5a$ komplementieren konnte, wächst die Chimäre *pex5a:TPR_{pex5b}*, exprimiert unter dem *pex5a*-Promoter, auf Fettsäuren beinahe wie der WT. Dabei könnte die NTD des Pex5a-Proteins direkt ein Cargo, welches essentiell für die peroxisomale β -Oxidation ist, binden und es in die peroxisomale Matrix translozieren; Pex5a könnte aber auch eine weitere, bisher unbekannte Rolle im Proteinimport oder der Regulation des peroxisomalen Proteoms einnehmen.

Es ist möglich, dass weitere peroxisomale Matrixproteine mit den NTDs von Pex5a und Pex5b interagieren. Aus der Literatur sind verschiedene Beispiele für solche Interaktionen aus anderen Organismen bekannt (siehe [1.2.3](#) [PTS-unabhängiger Import](#)). In *U. maydis*-Zellen konnte das Protein Um01966 mit maskiertem PTS1 die Peroxisomen erreichen und es wäre spannend zu klären, ob der Import durch eine Interaktion mit der NTD von Pex5a oder über den Piggy back-Mechanismus erfolgt. Weitere Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation weisen kein PTS, weder ein C-terminales PTS1 noch ein N-terminales PTS2, auf. Dazu gehört Um04324, eine peroxisomale Acyl-CoA-Oxidase. Das Fehlen eines PTS ist innerhalb der Pilze konserviert [\[163\]](#) und in den Hefen *S. cerevisiae* und *Y. lipolytica* erfolgt der Import ins Peroxisom Pex5-abhängig [\[140, 169\]](#). Auch das multifunktionelle Enzym Mfe2 (Um10038) besitzt kein PTS, findet sich aber in *U. maydis* in den Peroxisomen [\[170\]](#), wobei der Import über die NTD von Pex5b vermittelt wird (Augustina Gabrilavičiūtė, persönliche Mitteilung). TPR-unabhängige Interaktion oder der Piggy back-Mechanismus ist auch für die Enzyme Pot1 (Um02715) und das Sterol-Carrier-Protein Um01986 wahrscheinlich, da auch diese Proteine keine PTS (und kein mTS) aufweisen [\[163\]](#). Um zu überprüfen, welche Enzyme in ihrer peroxisomalen Lokalisation von der NTD von Pex5a oder Pex5b abhängen, könnte für die Expression der GFP-Protein-Fusionen der Stamm $\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$ genutzt und ein Stamm mit *pex5a* Δ TPR $\Delta pex5b$ generiert werden. Diese Stämme exprimieren nur die NTDs der beiden PTS1-Rezeptoren. Weniger effizient als das *full-length*-Protein fungierte HA-Pex5b²⁻⁵⁴⁴, welches aus der NTD von Pex5b, fusioniert an ein HA-Tag, besteht. Deshalb könnte es an dieser Stelle sinnvoll sein, statt die TPR-Domänen zu deletieren nur einzelne Aminosäuren in diesen Domänen zu mutieren. Die Mutationen konservierter Aminosäuren resultierten in der Vergangenheit in peroxisomalen Importdefekten [\[242\]](#). Auf diese Weise könnte man auch in *U. maydis* effektive, aber für den PTS1-Import defekte Pex5-Proteine exprimieren.

Ölsäure als Kohlenstoffquelle scheint für den *U. maydis*-Stamm $\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$ noch toxischer zu sein als für die Doppeldeletion $\Delta pex5a \Delta pex5b$. Das PTS1-Protein mCherry-SKL verblieb in beiden Stämmen im Zytosol, weil kein - im klassischen Sinne - funktionelles Pex5-Protein mit TPR-Domäne vorlag. In *U. maydis* $\Delta pex19$ -Stämmen wurde beobachtet, dass die β -Oxidation von Fettsäuren ohne funktionelle Peroxisomen eingeschränkt zytosolisch ablaufen kann [\[254\]](#). Außerdem zeigten die Experimente von Freitag *et al.*, dass auch unter Glukosebedingungen Fettsäuren in *U. maydis*-Zellen verstoffwechselt werden [\[254\]](#). Wird angenommen, dass einige peroxisomale Matrixproteine über die NTD von Pex5b das Peroxisom betreten, könnten diese Proteine in der Mutante $\Delta pex5a pex5b\Delta TPR$ weiterhin vom Zytosol in die Peroxisomen transportiert werden. Dadurch würden Stoffwechselwege oder aufeinander aufbauende Reaktionen, die normalerweise gemeinschaftlich im Peroxisom lokalisiert

sind, auseinander gerissen werden. Dies könnte erklären, weshalb dieser *U. maydis*-Stamm ein eingeschränktes Wachstum auf Ölsäure- und Glukose-haltigen Agarplatten und in Flüssigkultur (Daten nicht gezeigt) aufweist.

Durch weitere Interaktionsstellen zwischen Pex5 und peroxisomalen Matrixproteinen könnten die PTS1-Rezeptoren ihre jeweiligen Cargos über die PTS1-Motive hinaus diskriminieren. Von Vorteil könnte dies sein, wenn über Pex5a und Pex5b eine Regulation des peroxisomalen Proteoms erfolgte. Da es in *U. maydis* für jeden Schritt der β -Oxidation von Fettsäuren mehrere katalysierende Enzyme gibt, vermuteten Camões *et al.*, dass einzelne Enzyme eine Substratspezifität entwickelt haben könnten [163]. Zusätzlich weist dieser Basidiomycet Enzyme für die peroxisomale α -Oxidation auf [163]. Je nach Eigenschaft der zu metabolisierenden Fettsäure könnten unterschiedliche Enzyme im Peroxisom benötigt werden und das peroxisomale Proteom könnte über Pex5a und Pex5b angepasst werden.

Camões *et al.*, 2015 verwendeten für die Untersuchung der mitochondrialen und peroxisomalen β -Oxidation in *U. maydis* eine Deletionsmutante für *pex3* [163]. Pex3 ist ein Membranprotein, wird während der peroxisomalen Biogenese benötigt und Deletionsmutanten weisen keinerlei funktionelle Peroxisomen auf [198]. Dennoch konnten die Autoren Wachstum dieser Deletionsmutante zeigen, wenn zur Verstoffwechselung der angebotenen Fettsäuren die peroxisomale β -Oxidation benötigt wurde, während die in dieser Arbeit generierte Mutante keinerlei Wachstum mehr unter Ölsäurebedingungen zeigte (Abbildung 9). Der Unterschied könnte sich zum einen dadurch erklären, dass Camões *et al.* eine Ölsäurekonzentration von 0,001 % wählten, während in dieser Arbeit 0,2 % (v/v) dieser Fettsäure eingesetzt wurden. Es ist wahrscheinlich, dass eine höhere Konzentration der toxischen Kohlenstoffquelle zu früherem Sterben der Zellen führt. Zusätzlich lösten Camões *et al.* die Ölsäure in Ethanol, wodurch die für die Wachstumsversuche verwendeten Agarplatten zusätzlich 0,01 % Ethanol enthielten [163]. Dass *U. maydis*-Mutanten mit peroxisomalen Defekten unter der Anwesenheit von Ethanol und 0,001 % der Fettsäure besser wachsen, zeigt die Abbildung 35 im Anhang. Allerdings zeigten die Mutanten bereits auf der Kontrollplatte, die nur Ethanol und weder Glukose noch eine Fettsäure enthielt, denselben Wachstumsphänotyp. Dies könnte zum einen bedeuten, dass Pex5a genauso für die Verstoffwechselung von Ethanol essentiell ist. Zum anderen könnte es darauf hinweisen, dass der beobachtete Wachstumsphänotyp der *pex*-Mutanten darauf zurückzuführen ist, dass bereits andere grundlegende enzymatische Reaktionen gestört sind und dass der beobachtete Phänotyp unter Fettsäurebedingungen ein sekundärer Effekt ist.

3.5 Pex5a und Pex5b als Regulatoren des peroxisomalen Proteoms

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PTS1-Rezeptoren von *U. maydis*, Pex5a und Pex5b, nicht die Funktion des jeweils anderen übernehmen können. Auch ist es wahrscheinlich, dass beide Proteine nicht nur auf dem konventionellen Weg über ihre PTS1-bindende TPR-Domäne Cargos in die peroxisomale Matrix transferieren können, sondern dass es Matrixproteine gibt, die mittels der NTDs beider Pex5 ins Peroxisom gelangen. Zusätzlich wurde hier nachgewiesen, dass sich die beiden Importrezeptoren in ihrer Cargospezifität unterscheiden. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse

darauf hin, dass Pex5a und Pex5b unterschiedliche Targets haben und dass darüber das peroxisomale Proteom reguliert werden könnte.

Peroxisomen sind zwar meistens rund und beherbergen charakteristische Stoffwechselwege, können sich aber in Anzahl und Proteinrepertoire an die Entwicklungsphase und die Umgebungsbedingungen anpassen [2, 3]. Dabei muss die Anpassung in irgendeiner Art und Weise reguliert werden. In Bäckerhefe beispielsweise erfolgt die Adaptation des peroxisomalen Inhalts an Umweltbedingungen über unterschiedliche PTS-Rezeptoren. Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert für zwei PTS2-Co-Rezeptoren, Pex18p und Pex21p [72, 138] und zwei PTS2-Proteine [139]. Eines ist die Thiolase Fox3p, die an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt ist und unter Ölsäurebedingungen exprimiert wird [139, 255]. Die Expression des PTS2-Co-Rezeptors Pex18p wird unter denselben Bedingungen induziert, während der PTS2-Rezeptor Pex7p konstitutiv exprimiert wird [139, 256]. Pex21p kann in einem $\Delta pex18$ -Deletionsstamm als PTS2-Co-Rezeptor für Fox3p fungieren, jedoch ist Pex18p der bevorzugte Co-Rezeptor für den peroxisomalen Import dieses Enzyms [72, 139]. Das zweite PTS2-Protein in *S. cerevisiae* ist Gpd1p, eine Glycerol-3-phosphatdehydrogenase, die unter hyperosmolaren Bedingungen im Zytosol Glycerol produziert [257]. Dazu passend wird die Expression dieses Enzyms unter hyperosmotischen Bedingungen induziert, während Pex21p konstitutiv exprimiert wird [139]. Pex21p fungiert immer dann als PTS2-Co-Rezeptor, wenn Pex18p nicht vorhanden ist, wie unter Abwesenheit von Ölsäure und unter Salzstress, weshalb Pex21p der exklusive PTS2-Co-Rezeptor für den peroxisomalen Import von Gpd1p ist [139]. Auch im PTS1-vermittelten Import weist *S. cerevisiae* ein ähnliches System auf, da das Genom dieser Hefe für zwei PTS1-Rezeptoren kodiert [128, 129, 202]. Pex5p fungiert als genereller PTS1-Rezeptor und wird konstitutiv exprimiert, während die Expression von *pex9* durch die Anwesenheit von Ölsäure induziert wird [128, 129]. Die einzigen Cargos des PTS1-Rezeptors Pex9p sind die Malatsynthasen Mls1p, Mls2p (-SKL) und wahrscheinlich die Glutathiontransferase Gto1p [128, 129]. Mls1p und Mls2p können auch über Pex5p ins die Peroxisomen transportiert werden, wobei der Import nach Deletion einer der beiden paralogen PTS1-Rezeptoren weniger effizient ist [128]. Folglich lokalisieren die beiden Enzyme Mls1p und Mls2p nur unter Ölsäurebedingungen peroxisomal, während sie sich unter Anwesenheit von Glukose oder Ethanol im Zytoplasma befinden [128, 258]. Die sich ändernde Lokalisierung adaptiert die Zelle an die Umweltbedingungen: Wenn Ethanol als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, wird im Zytosol Acetyl-CoA produziert und Mls1p agiert dort als Acetyl-CoA konsumierende Malatsynthase. Unter Anwesenheit von Ölsäure jedoch fällt Acetyl-CoA hauptsächlich im Peroxisom an und durch die induzierte Expression von Pex9p wird das zuerst zytosolisch vorliegende Enzym Mls1p ins Peroxisom transportiert [128, 129].

Auch in *U. maydis* wäre eine Anpassung des peroxisomalen Proteoms an die Umweltbedingungen denkbar, wobei die Expression der PTS1-Rezeptoren dafür auf DNA- oder zumindest Proteinebene reguliert werden müsste. Während des Lebenszyklus von *U. maydis* werden *pex5a* und *pex5b* tatsächlich differentiell reguliert, wobei die Expression von *pex5b* während der Filamentbildung induziert und in Tumoren herunterreguliert wird, während *pex5a* unter diesen Bedingungen eine gegensätzlich ex-

primiert wird (Marc Strickert, Esmeralda Reyes-Fernandez, persönliche Mitteilung). Spannend wäre, herauszufinden, ob die Expression der beiden Gene in axenischer Kultur als Antwort auf verschiedene Kohlenstoffquellen oder sogar verschiedene Fettsäuren differentiell reguliert wird. Das Protein Pex5b ist essentiell sowohl für den peroxisomalen PTS1- als auch PTS2-Import in *U. maydis* und müsste deshalb immer in den Zellen vorhanden sein. Vorstellbar wäre, dass die Heterooligomere, die wahrscheinlich während des PTS1-Imports aus Pex5a und Pex5b gebildet werden, eine ungleiche Anzahl der beiden PTS1-Rezeptoren aufweisen. Wenn in Anpassung an die Umweltbedingungen mehr Cargos über Pex5b importiert werden müssten, könnte die Expression von *pex5a* im Vergleich zu *pex5b* herunterreguliert werden und folglich Pex5b vorwiegend oder sogar ausschließlich als PTS1-Rezeptor fungieren. Agierte allerdings Pex5a als Hauptimporter und es bildeten sich Heterokomplexe mit Pex5a-Überschuss, würde eine basale Expression von *pex5b*, wie in Tumoren gezeigt, möglicherweise ausreichen, um als PTS1-Co-Rezeptor für Pex5a zu dienen. In diesem Modell wäre es sinnvoll, wenn Pex5b vor allem solche Enzyme in die peroxisomale Matrix importiert, die dort grundlegende Stoffwechselwege katalysieren, wodurch ein konstitutiver Import dieser Proteine gewährleistet wäre, unabhängig davon, ob *pex5a* oder *pex5b* stärker exprimiert würden.

Es ist nicht bekannt, ob Pex5-Proteine, die auch als PTS2-Co-Rezeptor fungieren, im Komplex mit Pex7 und dem PTS2-Protein zusätzlich ein PTS1-Protein gebunden haben. Dasselbe trifft zu, wenn Pex5 über die NTD mit einem PTS-losen Cargo interagiert. Würde ein Pex5-Protein neben einem PTS1-Protein gleichzeitig ein PTS2-Protein oder ein PTS-loses Protein binden, würde das die Effizienz des Imports steigern. Dabei müsste aber genug Raum für Interaktionen mit dem Docking-Komplex und der DTM verbleiben.

In dieser Arbeit wurden PTS1-Proteine durch Expression einzelner GFP-Fusionsproteine in verschiedenen *U. maydis*-Stämmen auf ihre Rezeptorspezifität untersucht. Das Labor von Maya Schuldinger fand den Pex9p-Rezeptor in *S. cerevisiae* mittels der selbst entwickelten SWAp-Tag (SWAT)-Methode, wobei eine parentale Bibliothek einfach modifiziert und im Folgendem mit hohem Datendurchsatz gescannt werden kann [239]. So könnten in Hefezellen die *U. maydis* Proteine Pex5a und Pex5b nach Deletion der hefe-eigenen PTS1-Rezeptoren exprimiert und im Folgenden die Lokalisierung von PTS1-Proteinen untersucht werden. Damit könnte einfach herausgefunden werden, welche PTS1-Motive vorwiegend von *UmPex5a* oder *UmPex5b* erkannt werden. Von Vorteil wäre hier, dass Pex5a im Gegensatz zu *U. maydis* in Bäckerhefe auch in Abwesenheit von Pex5b funktionell ist. Mit dieser Methode würden allerdings keinerlei Informationen darüber gewonnen werden, welche *U. maydis*-Proteine auf unkonventionelle Weise, entweder über den Piggy back-Mechanismus oder Interaktion mit den Importrezeptoren außerhalb der TPR-Domänen, ins Peroxisom gelangen. Mehr Aussagekraft hätte die Bestimmung des peroxisomalen Proteoms in verschiedenen Pex5- oder Pex7-Mutanten. Peroxisomen lassen sich nach Lyse der Zellen mittels einer Kombination aus differentieller Zentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation aufreinigen, wobei anschließend mittels Western Blot auf Anreicherung des zu untersuchenden Proteins in verschiedenen subzellulären Fraktionen untersucht wird [259]. Nach Aufreinigung der Peroxisomen durch differentielle und Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation und

anschließender Massenspektrometrie (MS) konnten in menschlichen Leberzellen neue, mit den Peroxisomen assoziierte Proteine gefunden werden [260]. Eine weitere Methode, Peroxicretion genannt, wurde für den Organismus *Aspergillus niger* entwickelt. Dabei wird die Oberfläche der Peroxisomen mit v-SNARE-Proteinen versehen, die dann mit t-SNAREs in der Plasmamembran fusionieren und dabei ihren peroxisomalen Inhalt in die extrazelluläre Matrix entlassen [261]. Diese Methode konnte leider nicht in *U. maydis* etabliert werden (Bachelorarbeit Roman Martin). Aus Mäusfettschmalz konnten Peroxisomen mittels eines Epitop-Tags und an *beads* gekoppelte Antikörper aufgereinigt werden und anschließend über LC-MS/MS-Analyse das peroxisomale Proteom ermittelt werden [262]. In *U. maydis* könnte beispielsweise Pex3 C-terminal mit einem Epitop-Tag versehen werden, da der C-Terminus dieses Peroxins ins Zytosol ragt und ein Tag an dieser Stelle nicht mit der peroxisomalen Biogenese und Funktion interferiert (Daten nicht gezeigt). Aufreinigung von Peroxisomen aus verschiedenen *U. maydis* Mutanten würde sowohl Rückschlüsse auf die Cargo-Spezifitäten der peroxisomalen Importrezeptoren zulassen als auch deutlich aufzeigen, ob und wie sich das peroxisomale Proteom an verschiedene Umgebungsbedingungen anpasst.

3.6 Verwandtschaftsbeziehungen zu Pex5-Proteinen anderer Organismen

Interessanterweise kodieren nicht nur *U. maydis*, *C. neoformans* und *S. cerevisiae* für zwei PTS1-Rezeptoren, sondern ein Pex5-ähnliches Protein findet sich in verschiedensten Wirbeltieren [129]. Im Menschen wird das Pex5-ähnliche Protein im Gehirn exprimiert, ein Organ, in dem Peroxisomen eine große Rolle spielen [202]. Um die Pex5-Proteine von *U. maydis* in Relation zu den Pex5-Proteinen anderer Organismen zu setzen, wurde ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 30). Dieser umfasst die in Abbildung 32 (Anhang) miteinander verglichenen PTS1-Rezeptoren als auch Pex5 und Pex5-ähnliche Proteine von Wirbeltieren. Mit dieser Methode konnte zuvor gezeigt werden, dass sich die Pex5 und die Pex5-ähnlichen Proteine auf verschiedenen Ästen des Baumes befinden [129]. Auffällig an den Pex5-ähnlichen Proteinen ist beispielsweise, dass sie kein in PTS1- und PTS2-Co-Rezeptoren konserviertes C-terminales Cystein aufweisen. Der Baum zeigt deutlich, dass sich die PTS1-Rezeptoren der Wirbeltiere und der Pilze voneinander unterscheiden. Dabei zeigt ein Pex5-Protein von *C. neoformans* und Pex5b von *U. maydis* Ähnlichkeiten zu den PTS1-Rezeptoren der Ascomyceten, während UmPex5a und das andere Pex5 von *C. neoformans* interessanterweise eher den Pex5-Proteinen der Pflanze *A. thaliana* und dem Trypanosom *T. brucei* gleichen (Abbildung 30).

Die PTS1-Motive der Pex5a und 2 aus *H. sapiens* und Gapdh2 aus *P. blakesleeana* wurden weder von UmPex5b noch von *S. cerevisiae* Pex5p und Pex9p erkannt. Dagegen wurden sie in *U. maydis* von Pex5a in die Peroxisomen importiert. Der phylogenetische Baum (Abbildung 30) zeigt, dass die Pex5, die diese Motive nicht erkannten, zu einer Gruppe gehören, während UmPex5a in einem anderen Ast des Baumes zu finden ist. In den Modellorganismen *T. brucei* und *A. thaliana* ist der Pex5-abhängige peroxisomale Proteinimport gut erforscht und ein Vergleich der Peroxine, sowohl der Importrezeptoren als auch der Proteine der DTM und des Extraktionskomplexes, könnte hilfreich sein, aufzuklären, weshalb Pex5a als alleiniger PTS1-Rezeptor in *U. maydis* nicht funktionell ist. Sowohl Pflanzen als

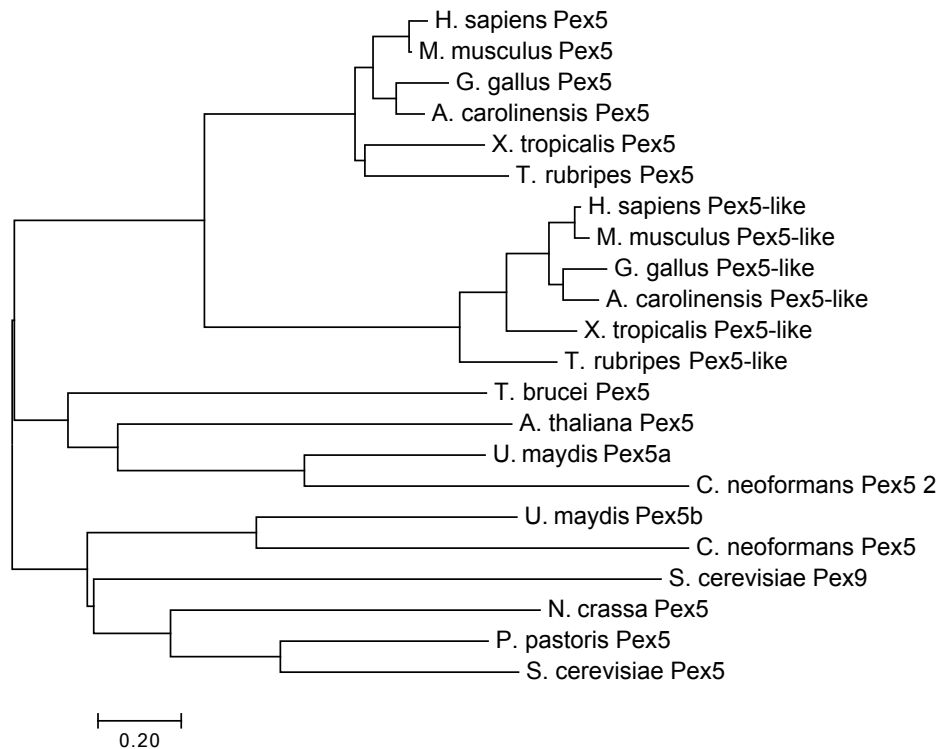
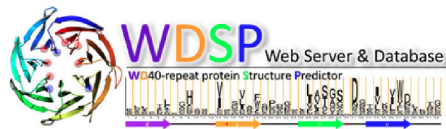


Abbildung 30: **Phylogenetischer Baum: Pex5-Proteine verschiedener Organismen.**

Der phylogenetische Baum zeigt die Relationen der Pex5- und Pex5-ähnlichen („Pex5-like“) Proteine verschiedener Organismen. Dabei separieren sich die Wirbeltiere von den Pilzen, Pflanzen und Trypanosomen. Überraschenderweise zeigen ein Protein von *C. neoformans* und Pex5a aus *U. maydis* mehr Ähnlichkeiten zu den PTS1-Rezeptoren von *A. thaliana* und *T. brucei*, während sich die anderen beiden Pex5 dieser Basidiomyceten eher mit den Importrezeptoren der Ascomyceten vergleichen lassen. Dargestellte Organismen: *Homo sapiens* (Mensch), *Mus musculus* (Maus), *Gallus gallus* (Huhn), *Anolis carolinensis* (Echse), *Xenopus tropicalis* (Frosch), *Takifugu rubripes* (Fisch), *Trypanosoma brucei*, *Arabidopsis thaliana* (Pflanze), *Ustilago maydis* und *Cryptococcus neoformans* (Basidiomyceten), *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* und *Pichia pastoris* (Ascomyceten).

auch Trypanosomen weisen spezialisierte Peroxisomen auf. In Pflanzen sind es Glyoxysomen und die Blattperoxisomen [8] und in Trypanosomen die Glykosomen [15]. Es könnte spannend sein, in *U. maydis* zu untersuchen, ob Pex5a an der Spezialisierung von Peroxisomen beteiligt ist. Für verschiedene Proteine konnte in *U. maydis* eine differentielle Verteilung auf die Peroxisomen gezeigt werden, wobei diese nach Deletion von *pex5a* abnimmt (Julia Ast und Domenica Martorana, unveröffentlichte Daten). Diese differentielle Verteilung könnte möglicherweise geeignete subperoxisomale Bedingungen schaffen um Sekundärmetaboliten zu produzieren.

4 Anhang



Home Predictor DataBase ▾ Contact

WDSP is done.

Um03596_2113 This protein is a WD40 protein. The average score of repeats is: **95.32**

The estimated Q3 accuracy is : **95±5%**

Topology of Um03596_2113:

Repeats	Score	Start	End	Strand_d	Loop_da	Strand_a	Loop_ab	Strand_b	Loop_bc	Strand_c	Loop_cd	H_bonds	Hotspots_on_the_top_face
WD1	63.75	6	61	PPLARV	RTPGYA	GYIAW	SPFFAH	RLAVAS	SANYGLVGNG	RLHILS	LSPPASSGPA	NA	Y19
WD2	97.59	62	106	SLTIEK	VFDTDG	LYDLAF	SEAHEN	QLVTAS	GDG	SIKLWD	CALQE	NA	Y76
WD3	149.79	107	150	HPIRNW	SEHTRE	VFCVDW	NNINKE	LFASS	WDA	SVRIWH	PERPT	pentad	E118 F120 W137
WD4	111.61	151	195	SLTAIT	AHTGC	VYACAF	SPHNPD	LLATAC	ADG	HLRLFD	LRQSTAQ	triad	Y163
WD5	105.47	196	253	QPSVTL	PVGGE	VLCLDW	NKYRPM	TIATGS	TDR	VIKTWD	LRSATNNTHVGPVTPLQMG	NA	E206 L208
WD6	145.41	254	313	TPTAAI	LGHEYA	IRKVAY	SPHSQP	MLASAS	YDM	TARIWD	TDAAAMAGLHTAQHAQPPAT	pentad	R267 Y284
WD7	111.01	314	353	GTMRKI	HDHTEF	VVGVAW	SFFQDG	LVASTA	WDS	ETHLWT		tetrad	F326 W345

Abbildung 31: WD-40 Repeats in Pex7 von *U. maydis*

Das Tool WDSPdb [135] wurde genutzt, um die WD-40-Repeats von Um03596 vorherzusagen. Wie andere Pex7-Proteine weist auch *UmPex7* sieben WD-40-Repeats auf. Ein potentielles di-aromatisches Pentapeptid (WxxxF/Y) befindet sich im WD1-Repeat beginnend im β -Faltblatt a und Loop zwischen den β -Faltblättern a und b.

Tabelle 3: *U. maydis*-Proteine mit möglichem PTS2

Im Genom von *U. maydis* finden sich 122 Proteine mit dem Konsensus R/K-L/V/I/Q-X5-Q/H-L/A/F [143] nahe am N-Terminus. Von diesen 122 Proteinen ist von 78 Proteinen oder deren Homologen bekannt, dass sie ihre Funktion außerhalb des Peroxisoms erfüllen oder das bestimmte Aminosäuren an den Positionen x2 oder x3 die Struktur des PTS2 zerstören [144]. Die übrigen 28 Proteine sind hier mit ihrer Beschreibung aus der MIPS-Datenbank dargestellt. Die Aminosäuren der Konsensussequenz sind fett dargestellt. Zur Vorhersage anderer Zielsteuerungssequenzen wurden TargetP 1.1 (SP - ER, mTS - Mitochondrium) [263] und der PTS1-Predictor [105] [106] verwendet.

Chromosom/Gennummer	mögliches PTS2 (bis Aminosäure #)	andere Signale	Beschreibung (Pedant)	Anmerkung
chr01:UMAG_00092	MAQTK EDQQK HAYAA TLQRL ERIRN HL (27)	—	related to levodione reductase	Homolog in <i>Penicillium chrysogenum</i> lokalisiert peroxisomal [264]
chr01:UMAG_00122	MRAEE GFQFE RFRVA SPWSS DPALR LTILR LFSSG RHA (38)	PTS1 (+14,318)	hypothetical protein	Acyl-CoA dehydrogenase [163]
chr01:UMAG_10088	MSTPT AAPSQ PLVWS PTPDE IQQTS LDKFR RLVNA RYHL (39)	PTS1 (+4,356)	related to Acetoacetyl-CoA synthetase	Funktion: 2 acetyl-CoA → acetoacetyl-CoA [163]
chr01:UMAG_00422	MGETN KLRIG YVPEH F (16)	—	hypothetical protein	konserviert in pathogenen Pilzen
chr01:UMAG_00583	MAASH QWHAG ELFIQ SQLGH SEAVA GAHAV FQPRL TAQHQ QF (42)	—	hypothetical protein	BLASTP: Oxidoreductase
chr01:UMAG_00825	MSPVY ESPCA VLLQL RHSTH SPWHK LAVQV CQF (33)	—	hypothetical protein	BLASTP: nur in nahen Verwandten von <i>U. maydis</i>
chr02:UMAG_01065	MVAKT TCDSS TTATS KQRSS LQHL (24)	—	hypothetical protein	BLASTP: nur in nahen Verwandten von <i>U. maydis</i>
chr02:UMAG_11277	MSKPE ERMKA EATQA LDAQD ELNCP GFESS RVFAL SAQL (39)	PTS1 (-2,100)	hypothetical protein	BLASTP: potential/putative lipid carrier
chr02:UMAG_01090	MAQRI TQLAS HL (12)	—	probable POT1 - acetyl-CoA C-acyltransferase, peroxisomal	N-Terminus vermittelt peroxisomale Lokalisierung (Abbildung 5) Abbildung 6

chr03:UMAG_10252	MSQ RV SQIAG HL (12)	—	related to 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase ist beteiligt in der Fettsäuresynthese
chr04:UMAG_10179	MATQF INWIK SPAGR QYFFS THF (23)	—	hypothetical protein	—
chr05:UMAG_11400	MTPPT ASFIN PATAG PQPGS FKLSK GSL HA (30)	—	probable Thiamin biosynthetic enzyme	—
chr05:UMAG_02397	MGLCE ANDSH QFVRS LDKLP TSDLV RFTLQ KPDVT RIFAS SLHL (44)	—	hypothetical protein	—
chr08:UMAG_11950	MADLS LTACL GYAHA KLACE HRLDK LDA HL (30)	—	hypothetical protein	—
chr08:UMAG_03239	MTSFA VQFAR QQRHA FQA (18)	mTS (0,878)	probable acetolactate synthase	katalysiert den ersten Schritt in der Valine-/Isoleucine-Biosynthese [163]
chr11:UMAG_12247	MLKID ALREL LGSDP GQ PRI QALLN QL (27)	—	hypothetical protein	—
chr12:UMAG_04223	MSAEA GPSNL VEVTS PEHFT EIMQK DL TRI SLLNF HA (37)	—	probable glutaredoxin	Gen wird in dem Stamm FB1Δrak1/FB1 differentiell exprimiert [265]
chr18:UMAG_05437	MASTD EARVK VLGNG IQL (18)	—	hypothetical protein	—
chr18:UMAG_12303	MTGKL QIQAT TLSSF EGMEA IASKP DVGSL VSSLH VEQ KR LEYVA LHL (48)	—	hypothetical protein	BLASTP: nur in nahen Verwandten von <i>U. maydis</i>
chr18:UMAG_05575	MTRGI EHIDT NPEII QARVN IHHL Q L (26)	—	hypothetical protein	—
chr19:UMAG_05370	MQASE HSSSN SKHTL PEQLA MRQKD FPNVP QRRID PPS RQ TGYWQ QA (47)	—	hypothetical protein	BLASTP: nur in nahen Verwandten von <i>U. maydis</i>
chr20:UMAG_05936	MSLTV DSIQQ RLGGY YTQL (19)	—	hypothetical protein	BLASTP: short-chain dehydrogenase/reductase

chr20:UMAG_05970	MSSIQ TTISP YDQSV VCE KQ LLTEA QL (27)	—	related to aldehyde dehydrogenase	—
chr21:UMAG_11593	MVESR RVLIA NRGEI ACRLM RTYR Q F (26)	mTS (0,791), PTS1 (-3,980)	related to PYC2 - pyruvate carboxylase 2	beteiligt in der Gluconeogenese
chr21:UMAG_06070	MPSPV SASAT SSIRR LSQTA RQL (23)	mTS (0,946)	probable IPP1 - inorganic pyrophosphatase	Interaktion mit Clp1 im Yeast Two Hydrid-Screen [266]
chr22:UMAG_06167	MASTR IQNIT THL (13)	—	probable PMI40 - mannose-6-phosphate isomerase	—
chr23:UMAG_06367	MSTVA LSSST SRPPH SSRSL PVITV FSHPA ARLIK TVP QL (40)	mTS (0,869)	hypothetical protein	am filamentösen Wachstum beteiligt [267]
chr23:UMAG_11001	MLLPT PTQTL AGGKV KVYVV DLHA (24)	PTS1 (+8.246)	related to enoyl-CoA hydratase protein 3	beteiligt an der peroxisomalen β -Oxidation [163]

Tabelle 4: **Vorhersage der TPRs für Pex5a mittels TPRpred**

Das Tool TPRpred [193, 194] sagte für Pex5a sechs TPR voraus.

The sequence name : Wed_Jul_06_1

Per-protein P-value for being TPR : 1.9E-34

Probability for being TPR : 100.00%

Repeat	Begin	Alignment	End	P-value
TPR	456	SEAWRRLGECQAMNEKEAQAIRALEEAIKIDENN	489	3.0e-10
TPR	490	LEAYMSLAISYTNEGYDTAAHQTLEERYISRAYPN	523	1.3e-04
TPR	531	AEISGSKDPIEGTEGNPWASLNRVTDLFLQAARQ	564	7.0e-01
TPR	573	PEVQVGLGVLFYTQSAYEQAQDCFNSALSVRPND	606	6.2e-11
TPR	607	FLLWNRLGATLANGGKPEEAIAAYHKALELRPTF	640	1.1e-12
TPR	641	TRAIYNLSVSCNLNLAHHEAAEHLLAALSLLQQTH	674	8.4e-08

Tabelle 5: **Vorhersage der TPRs für Pex5b mittels TPRpred**

Das Tool TPRpred [193, 194] sagte für Pex5b sieben TPR voraus.

The sequence name : Wed_Jul_06_1

Per-protein P-value for being TPR : 4.8E-33

Probability for being TPR : 100.00%

Repeat	Begin	Alignment	End	P-value
TPR	549	PYIASTRHHAHAGGLPAGLESVLEKEAAVQQDP	582	6.3e-02
TPR	585	ASAWYDLGVKQQENEREVQAIAALRKALDLNANL	618	1.9e-08
TPR	619	RDAWLALAVSYTNENDRTAAYEAIERWIESNDKY	652	6.7e-06
TPR	659	AKAEVDAANLGKQGRSDSVSSHSTSASVVEKHS	692	1.2e-02
TPR	713	ADVQVALGVFNSSDYDKAVDCFSTALSVRPQD	746	1.7e-12
TPR	747	WLLYNRLGATLSNSGRSAEAIQYYHHALNLQPEF	780	3.0e-11
TPR	781	VRCHFNLISCLNLKMYQDAAEHIYTALTLLQAE	814	6.0e-07

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

TbPex5      -----MDCGAG--FALGQQLAKDALHMQGGVRPGTTGNVEQDALMTGMMVPTG
AtPex5      MAMRDLVNGGA-ACAVPGSSSSSNPLGALTNAL-----LGSSSKTQERLKEIPNANRSG
CnPex5B     --MSAFLSGASVQCG-P-----TSALKNVSDRI-----NVDRSLQDRLA-----YT
CnPex5K     --MQSFLNG-A-ECG-P-----SNPLKQVAQRE-----GVDHSLFKDRLA-----
ScPex5      MDVG-----SCSVG-----NNPLAQLHKHT-----QQNKSLQFNQKN-----NGRLN
PpPex5      ---MSLIGGGS-DCAAG-----SNPLAQFTKHT-----QHDTSLQQSMRN-----G
NcPex5      ---MSFMGG-A-ECSTA-----GNPLSQFTKHV-----GDDKSLQHDRLA-----N
UmPex5a     MAFQSMNLGA--ECSTS-----NNGLAQMLKHT-----QQDRSIQQGDRT-----FT
HsPex5L     MAMRELVEA---ECG-G-----ANPLMKLAGHF-----TQDKALRQEGLR-----PG
UmPex5b     --MSDLVSGGA-GCG-P-----SNPLQNIKRF-----GQDRGAQQDTFA-----SS

```

```

TbPex5      PMEDWAQHFAAHQHQQHQQHQQMMQRQHNDALMIQQQHRDMEEAFRASARAGAPQQANAG
AtPex5      P---RPQFYSEDQQIRSLPGSELDQPLLQPGAQGSEFFRGFR-SVDQNLGAWDEVQQG
CnPex5B     S---NASGSSSKQPFRAQLAQLPVNQSPKQ-----VPGPPSTFDLS
CnPex5K     -----PQSSTQLNAFRSSPSFSLQGQAPVAR-----HANPIPHPNLSHLSAALAESSRS
ScPex5      E---SPLQGTNKPGISSEAFISNVNAISQENMANMQRFINGEP-----LIDDKRRMEIG
PpPex5      E---FQQ--GNQRMNRNESTMSPMERQQMDQ-----FMQQQN-----NPAPNFQ
NcPex5      R---GPN--AAVGGFRSINR-GPGQDEMVG-----FLNQTP-----EMAHMPLEQG
UmPex5a     G---QPQ--TGSTGMRQQHQAGLNSDADA-----FFRQQQ--AASMPGAASSAFDLQ
HsPex5L     P---WPPGAPASEAASKPLGVASEDELVAE-----FLQDQNAPL---VSRAPQTFKMD
UmPex5b     P---FAQ--QQSPSFRSHNAAASSSQQQPA-----FFNAPSQQVPLASQGNLHDAFDVS

```

```

TbPex5      PLMMPPGP----MMMAGGMAPMM-----
AtPex5      GPMPPMGP-MFEPVQPTFEPPQVRVLSNFLHSFVESSRGGIPFRPAPVPVLGLSQSDKQC
CnPex5B     SLRQQLSP-----VPSTSHASD-----
CnPex5K     GSASPVPAAASQMPLGPNFE-----
ScPex5      PSSGRLPPFSNVHSLQTSANPTQ-----
PpPex5      PMQHELVN-----MQQNMNAPQQ-----VAN-----
NcPex5      HMLHLDPS-----QGAHMRAPNA-----
UmPex5a     AMRNELNS-----AVPSFQHPNA-----G-----
HsPex5L     DLLAEMQQIEQSNFRQAPRAPGV-----
UmPex5b     QLRSNLPSGSRMPMQSQHHRSTP-----GPSMADLEASFRPAFSR

```

```

TbPex5      -----HAGGFMMGGM-----PQMMPC-----
AtPex5      IRDRSSIMARHFFADRGEFFINSQVN-----ALLSSLDIDDG
CnPex5B     -----WASDFVPLTG-----PTASKY-----
CnPex5K     -----TRWNDAMVNLKSS-----PSMSQA-----
ScPex5      -----IKG-----VNDISH-----
PpPex5      -----NSWNQEFMRKD-----PMVANA-----
NcPex5      -----SPAWAQDFHNTQA-----AMEAAF-----
UmPex5a     -----AAWASQMPRNAT-----PSNADM-----
HsPex5L     -----ADLALSENWAQEFLAAGD-----AVDVTQ-----
UmPex5b     SSTIQAAPRAAVQSGWASDFLSAEASQSSVQAQPAQQMHVDRHSSHAHPNVIPMGHMG

```

```

TbPex5      -----APGMNMGMAPVATMSPATTNTV-----SGAREGATAVSS
AtPex5      IQARGHVPGRFRELDDYWNESQAVVKPNLHPADN-----WAAEFNQHGMDH
CnPex5B     -----TRSVASTKSGWQEEFSQHVAAPPLGTTRSQKPLYNAGLAPWEVPETQYQLQR
CnPex5K     -----PSRAPVQWAPPSSQESN-----WVNGYGEWQSSQ
ScPex5      -----WSQEFQGSNSIQ-----
PpPex5      -----PSAQVQTPVQSTN-----WAQDFQAGPEV
NcPex5      -----NAPPGTQFS-----ADEFSKFQQM-
UmPex5a     -----EAAFARRGAPARSMQPPAGSSA-----WAQQFGSSQHQQ
HsPex5L     -----DYNETDWSQEFISEVTDPLSVSPAR-----WAEELYEQSEEK
UmPex5b     MMSMPHTAPNRHFSPSHLQEQHQIHAIAAPQLDNAR-----WAEAFTAFEVSS

```

TbPex5	A-----APGVVDLGGDSAWAEKLHQA EWGQDYKDVEVHTVEGS
AtPex5	GG-----PDSW-----VQSFEQQHGVNGWATEFEQQSQ--LMSSQMRSMQM
CnPex5B	PALMRPSFRSHDIP ISEASLTFRPD IHAAPVSKYEEQIGQPTGSETLPLDESQQLLAR
CnPex5K	E-----KEKQRAIGSGPQMAHNSSY YSGMPGASMGSLSQGMGMG
ScPex5	-----NRNADTGNSEKAWQRGSTTASSRFQYPNTMMNYYAYA
PpPex5	QH-----HAQQHQHP ILSVPGVRAGI YGG-----
NcPex5	-----HPAAAPATASQMPAQRPMMGGGM-----MGMGMNMY-
UmPex5a	PA-----AMHQRPVSGSGSGSDP SAAYASRPIMGSYCGMGMGMGMGMGMS
HsPex5L	L-----WLGEPEGTATDRWYDEYHPEEDLQHTASDFVAKVDD-
UmPex5b	KP-----APEAPAATADVKPSEKVDYADPQER--DEFLARTAGR

P7-BD

TbPex5	TAQTVE-----EHAKTSKFYEFMDKIRKKELLVDEDSGEVVQGPDPD----
AtPex5	NIAAMEQTRKLAHTLSQDGNPKFQNSRFLQFVSKMSRGELI I DENQVKQASAPGE----
CnPex5B	TARSFVSNLETQSDILSAN-PKFAQSKFLSLLRGLGDEQVVVKEGQEVKGEEVGEATFV
CnPex5K	YQPSF-----SQMYGQNFQPPASSLPLEAQLDPRQMEALFARAE-----
ScPex5	SMNSLS-G-----SRLQSPAFMNQQQSGRSKEGVNEQE-----
PpPex5	-----GRLMGGSMNRAAQMQQNPAAQATSEQSQ-----
NcPex5	-----NMMQRPMPYQPMVGMHGPQMHNIPQQQLQPEGKKGK---K
UmPex5a	M-----GMMGGMGSMQQQRQYQPPQQTQSSQSRFTELDD-----
HsPex5L	-----PKLANSEFLKFVRQIGEGQVSLGAGSGRAQA-----
UmPex5b	LVSSVEHDQS-----SKFRQSNFLDLMRKIRDQAGTEGDNIVENAGTSTTTLDK

TbPex5	-----PDVEADTEYL-----ARLAAMEGINVP-----PSVMDHMQGQDG
AtPex5	-----WATEYEQQ-----YLGPSPWADQFANEKLSHGPE-----QWAEFASGRGQ
CnPex5B	ERNIVGNNWAEQFAKQ-KEKSIQPEAPTLAEAEYLERRSPYPGQKEYPALNSWVPALPT
CnPex5K	-----EDWKATDAAI-SQTAEKMDAKGKGKEREMPATEETVE-----ETITDNVEETKE
ScPex5	-----QPWTDQFEKLEKEVSENLDINDEIEKEENVSEVEQNK-----PETVEKEEGVYG
PpPex5	-----TQWEDQFKDI-----ESMLNSKTQE-----PKTKQQEQNT--
NcPex5	VVELDQNKWEEHFAQL-----EINGDEARAME-----PELNKMDEALLH
UmPex5a	-----ATWEEQFKKL---DAEQSEAESKKGKAKESADLLP-----SEAEQAESIRRE
HsPex5L	-----EQWAAEFIQQ-----QGTSDAWVDQFTRPVNTSALD-----MEFERAKSA
UmPex5b	GKARAHDLSSASTTQQ-AQPQSQOEAYSWANQMAVSGGLSHLP-----PSVQKSLAKNNV

TbPex5	VQRG-----TDE-----DMEG
AtPex5	QETA-----EDQWVNEFS-----KLNVDWIDE-----FAEG
CnPex5B	HTLVPPQTAPQAARLAAN--NGALWDQQYH-----DQEALIQSSPAPPEPRKNVHFDEH
CnPex5K	AKGD-----FEKVWESLKP-----EAERLNKLAE-WERD-----FSQ
ScPex5	DQYQ-----SD--FQEVWDSIHK-----DAEE-----VLPSE
PpPex5	-----FEQVWDIIVQ-----SYADVE
NcPex5	SETG-----AGD--LESIWRGIQA-----ERDAMKELDEIDVQD-----DFAK
UmPex5a	LDAIEQELTADGQEANSR--FEDLWRSMNARNGIPPSSADAELAK-WEEE-----LMKS
HsPex5L	IESD-----VDFWDKLQA-----ELEE
UmPex5b	QQSDLPQALRNEQQIQNQALNDMWAEDARSEAIEKQAMRESARAFVGDGGDV TARMRE

TbPex5	MMGDDVY-----DPSADVEQWAQE-YAQMQA-----
AtPex5	PVGDDSA-----DAWANA-YDEFLN-----
CnPex5B	PASRERSGVPSTLEEAISSPGNIPGAGWGWEQGLTHDFDEDVFEFNGQLRRAQESLEG
CnPex5K	FTNDEDDLDFVLNESFNRPD-----VGQASLDQQTDFLQDERLAMGE-----
ScPex5	LVNDDLN-----LGEDYLYLYG-----
PpPex5	LTNDQFQ-----AQWEKD-FAQYAE-----
NcPex5	FDSENLEK-----EDWTLN-----
UmPex5a	RADDGEQFGYT-----HPSGGLGGGQHGLDEMAALDGTEDALLDGFV-----
HsPex5L	MAKRDAE-----AHPWLS-DYDDLTS-----
UmPex5b	DDADAQEFERYQRLGANIPHASTFNRRWEEDLNRSTNEMEEDALDFVGRRWEGTKGRGY

TbPex5	-----MQERLQNNTD-----	-----YPFEANNPYMYHENP
AtPex5	-----EKNAGKQTSGV-----	-----YVFSDMNPYVGHPEP
CnPex5B	GVGKQESWDRQLQSDWEEFQRTPEGV-----	-----AHFRGMGTGDQSERYMFQSRNPYSTDEEE
CnPex5K	--GVVARDDGIPQIGN-----	-----YDFSSPSRHLSSLSA
ScPex5	-----GRVNGNIE-----	-----YAFQSNNEYFNNPNA
PpPex5	-----GRLNYGE-----	-----YKYEKNQFRNDPDA
NcPex5	-----GRLGADPIVQE-----	-----YLFEEDNLFRETNP
UmPex5a	-----VGPDGYPRLGQ-----	-----YRRSQONPFETHDPDP
HsPex5L	-----ATYDKG-----	-----YQFEEENPLRDHPQP
UmPex5b	PGAQTAEWDKLQSDWDNFEVTSAGIRPVTLPQSRGATTSMQPA	PVYRFLSDNPYIASTRH

* .

TPR1

TbPex5	---MEEGLSML-KLANLA---EALAFEAVCQKEP-----	-----EREEAWR
AtPex5	---MKEGQELF-RKGLLS---EALALEAEVMKNP-----	-----ENAEGRW
CnPex5B	-----LYFEVSRDSPTLKGILELESEVQKDS-----	-----TSHEAWY
CnPex5K	SYLWTEANHLLASGGSLS---EAAIMIEQFITRSTP-----	-----QERTQINVSLEAWA
ScPex5	---YKIGCLLMENGAKLS---EALAFEAAVKEKP-----	-----DHVDWL
PpPex5	---YEIGMRLMESGAKLS---EAGLAFEAAVQQDP-----	-----KHVDWL
NcPex5	---FEEGIRIMKEGGNLS---LAALAFEAAVQKNP-----	-----DHTEAWV
UmPex5a	---LSEGLRLLLANGGNLS---DAALLFEAATQORDTQGGTGGEVERGEVDRSRR	ERSEAWR
HsPex5L	---FEEGLRRL-QEGDLP---NAVLLF-AAVQQDP-----	-----KHMEAWQ
UmPex5b	-----HAAHAGGLPAGLESVLEKEAAVQQDP-----	-----QNASAWY

.

TPR2

TPR3

TbPex5	SLGLTQAENEKDGAI IALNHARM-LDPKDI-----	-----AVHAALAVSHTNEHNANAALA
AtPex5	LLGVTHAENDDDQQAIAAMMRAQE-ADPTNL-----	-----EVLALGVSHNTLEQATALK
CnPex5B	ALGLKQQENEREDQAILALSKVIQ-LNPQYR-----	-----PAYLALAVSYTNEGENEAAC
CnPex5K	TLGRVHAMDEKEEKALEAFQAGSKALEQEGITGKEG	AGEMLTNLAI SYVNESLDLAALS
ScPex5	RLGLVQTQNEKELNGISALEECLK-LDPKNL-----	-----EAMKTLAISYINEGYDMSAFT
PpPex5	KLGEVQTQNEKESDGI AALEKCLE-LDPTNL-----	-----AALMTLAISYINDGYDNAAYA
NcPex5	YLGQTQAQNEKEEAAIRALERAMK-LDPNNL-----	-----SAMMGLAVSYTNEGYDSTAYR
UmPex5a	RLGECQAMNEKEAQAIRALEAIAK-IDENN	-----EAYMSLAISYTNEGYDTAAHQ
HsPex5L	YLGTTQAENEQELLAISALRRCLE-LKPDNQ-----	-----TALMALAVSFTNESLQRQACE
UmPex5b	DLGVKQQENEREVQAI AALRKALD-LDANLR-----	-----DAWLALAVSYTNEENDRTAAYE

* * : : : . : * : * . * . * *

TPR4

TbPex5	SLRAWLLSQPQYEQ-LGSVNLQADVDID----	-----DLNVQSEDFFAAPNEYRECRT----	LL
AtPex5	YLYGWLNRNHPKYGA-IAPPELADSLYHA-----	-----DIAR-----	LF
CnPex5B	MLEDWIR-----	-----LKDSKNTTGADGQ-KGKDRNKLI	-----SL
CnPex5K	TLHRFLSL--THPAYAGPAPTTSSPLLTSP	TGSPWVLHQ-----	QMTD-----SF
ScPex5	MLDKWAET--KYPEIWSRIKQDDKFQKEGFT	HIDMNA-----	HITK-----QF
PpPex5	TLERWIET--KYPD-IASRARSSNPDL	-----GGDRIEQNK-----	RVTE-----LF
NcPex5	TLERWLST--KYPSVISPSNLSSAADM	-----FTDRAQLHE-----	RVTN-----LF
UmPex5a	TLERYISR--AYPN-IKAAPLSAEISGS---	-----KDPIEGTEGNPWASLNRVTD-----	LF
HsPex5L	TLRDWLRYTPAYAHLVTPAEEGAGGAGL---	-----GPSKRILGSLSDSLFLEVKE-----	LF
UmPex5b	AIERWIESNDKYREVVRKA	AEVDAANL--GKQGRS	SDSVSSHSTASVVEKH

: : : : : :

TPR5

TbPex5	HAALEMN-PN----	-----DAQLHASLGVLYNLSN--NYDSAAANLRAV-----	-----ELRPDDA
AtPex5	NEASQLN-PE----	-----DADVHIVLGVLYNLSR--EFDRAITSFQTAL-----	-----QLKPN DY
CnPex5B	IEIARQT-PH--EIDADVQVALGVLFNMSGGQ	DYSKAEDCFLAAL-----	-----EARPEDW
CnPex5K	LALAREQYQNGEKVDPDVQVGLGTLFYMMG--	-----EYDQARDCWVAAL-----	-----KERPEDY
ScPex5	LQLA----	-----NNLSTIDPEIQCLGLLFYTKD--DFDKTIDCFESAL-----	-----RVNPND
PpPex5	MKAAQLS-PDVASMDADVQTGLGVLFYSME--	-----EFDKTIDCFKAAI-----	-----EVEPDKA
NcPex5	LEAARLA-PDGDHMDPDVQVGLGVLFYGAE--	-----DYDKAVDCFQSAHSTELGTSNQREQIH	
UmPex5a	LQAARQ-NSAGQIDPEVQVGLGVLFYTG	-----AYEQAQDCFN	SAL-----SVRPND
HsPex5L	LAAVRLD-PT--SIDPDVQCGLVLFNL	SG--EYDKAVDCFTAAL-----	-----SVRPNDY
UmPex5b	IAMVRSG-GERGEIDADVQVALGVIFNSSE--	-----DYDKAVDCFSTAAL-----	-----SVRPQDW

* . : : * * : : : : * : :

	TPR6	TPR7
TbPex5	QLWNRLGATLANGNRPQEAALDAYNRRALDINPGYVRVMYNMAVSYSNMSQYDLAAKQLVRA	
AtPex5	SLWNKLGATQANSVQSADAI SAYQQALDLKPNYVRRAWANMGISYANQGMKYKESIPYYVRA	
CnPex5B	LLYNRLGATLANGSRSSSEAVQYYHQALRLHPGFVRALFNLGIAYMNLGEYQTAAQSILDA	
CnPex5K	LLWNRLGATLANGSSEEAVDAYRRALELKPGFTRAI SNLGVACLNIGVHREAAEHFLAA	
ScPex5	LMWNRLGASLANSNRSEEAIQAYHRAQLKPSFVRARYNLAVSSMNI GCFKEAAGYLLSV	
PpPex5	LNWNRLGAALANYNKPEEAVEAYSRAQLNPNFVRARYNLGV SFINMGRYKEAVEHLLTG	
NcPex5	LLWNRLGATLANGSRSEEAI AAYEKALAIHPNFVRARYNLGVSCINIGCHAEAAAGHLLAA	
UmPex5a	LLWNRLGATLANGGKPEEAIAAYHKALELRPTFIRAIYNLSVSCINLGAHHEAAEHL LAA	
HsPex5L	LLWNKLGATLAN--GQSEEAVAA YRRALELQPGYIRSRYNLGISCLNLGAHREAVEHFLEA	
UmPex5b	LLYNRLGATLSNSGRSAEAIQYYHHALNLQPEFVRCHFNLSISCLNLKMYQDAAEHI YTA	
	:* .***: :*	. :*: * .** :.* :*
TbPex5	IYM-----QVGGTTP-TGEASREAT-----RSMWDFFRMLLNVMNRPDLV	
AtPex5	LAM-----NPKADNA-----WQYLRLSLSCASRQDMI	
CnPex5B	LRL-----QHSEASE-AYAYGQNGG-GAKGVTSSETLWNSLKGACFYMNQDLV	
CnPex5K	LSL-----HPSQS-----EGNSQQISN-----DSAALWGTLRKSFIA MELPDLA	
ScPex5	LSM-----HEVNTNNKKGDVGSLLN-----TYNDTVIETLKRVIAMNRDDL	
PpPex5	ISL-----HEVEGVD-ASEMSSNOG-----LQNNALVETLKRAFLGMNRRDLV	
NcPex5	LDMHKSVEKSGREKARELLGCN-AGDSRSDNMMTQNRSTTLYDTLRRVFTQMGRDLA	
UmPex5a	LSLQQT-----HTLPDVP-EGEQPAPTP-LAEAGESHNLWSTLRRIFLVMDRLDLA	
HsPex5L	LNLM-----QRKSRGP-RGEGGAMSE-----NIWSTLRLALSMLGQSDAY	
UmPex5b	LTL-----QQAE AET-LGMAAEKDS-----ATSGSLWETFRVALELLNRSDLA	
	: :	. :. *
TbPex5	ELTY----AQNVEPFAKE-----FGLQSMML	
AtPex5	EACE----SRNLDLLQKE-----FPL----	
CnPex5B	KIVEKRDLSGLPLKFVDEE-----L-----	
CnPex5K	AKAR----PGTNLEVFRAAG-----FEF-----	
ScPex5	QEVK----PGMDLKRFKGE-----FSF-----	
PpPex5	DKVY----PGMGLAQFRKM-----FDF-----	
NcPex5	EKVT----TGVDPEIFRGE-----FDF-----	
UmPex5a	QKAH----VGSSLEQFRGEG-----FDF-----	
HsPex5L	GAAD----ARDLSTLLTM-----FGLPQ----	
UmPex5b	AKCSR RDINAFDLSDFVAPASGSGSAGGVGEVPFDY-----	
	.	.

Abbildung 32: Alignment von Pex5-Proteinen verschiedener Organismen.

Gezeigt ist das Alignment von Pex5-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Markiert sind die konservierten Aminosäuren Cystein und Lysin für Mono- und Polyubiquitinierung (orange), die Pex7-Bindedomäne (P7-BD; rot), die di-aromatischen Pentapeptide (WxxxY/Y; violett), das aus *S. cerevisiae* bekannte Pex14-Bindemotiv (pink) und die Repeats der TPR-Domänen (grün, blau, grau). Die in der TPR-Domäne in anderen Organismen konservierten Aminosäuren sind braun markiert. Auffällig ist, dass diese Aminosäuren auch in *U. maydis* nicht vom Konsensus abweichen. Das Alignment wurde mit MUSCLE (EMBL-EBI) durchgeführt [212, 213, 214, 215]. Tb, *Trypanosomas brucei*, At, *Arabidopsis thaliana*, Cn, *Cryptococcus neoformans*, Sc, *Saccharomyces cerevisiae*, Pp, *Pichia pastoris*, Nc, *Neurospora crassa*, Um, *Ustilago maydis*, Hs, *Homo sapiens*.

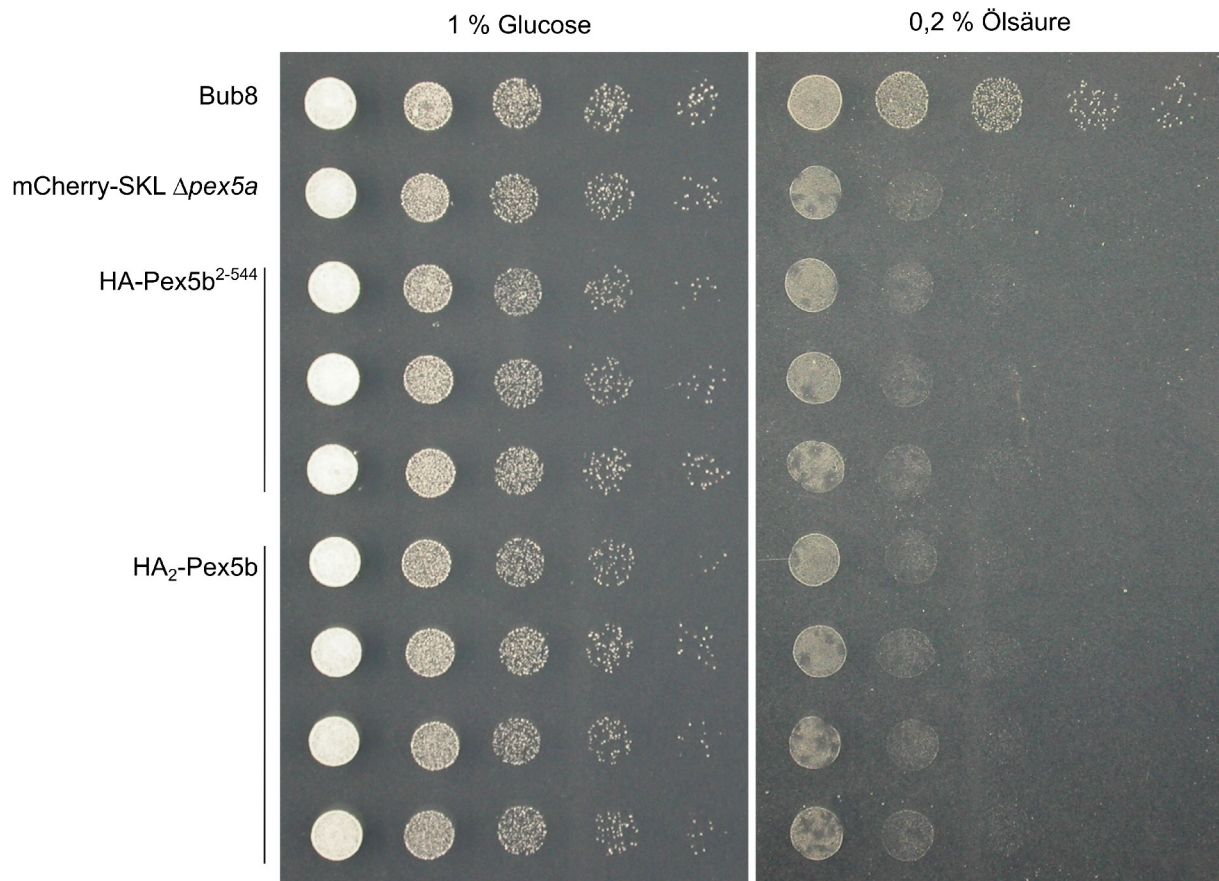


Abbildung 33: Eine Überexpression von *pex5b* kann den Deletionsphänotyp von *pex5a* nicht komplementieren.

Die Deletion von *pex5a* führt zu einem verminderten Wachstum dieser Zellen unter Ölsäurebedingungen im Vergleich zum WT (Bub8). Die *pex5a*-Deletion kann auch nicht durch Überexpression von *pex5b* unter dem *etef*-Promoter komplementiert werden, unabhängig davon, ob die NTD von *pex5b* (HA-Pex5b²⁻⁵⁴⁴) oder das vollständige Gen (HA₂-Pex5b) überexprimiert wird. Getropft wurden die Stämme in zehnfachen Verdünnungen ausgehend von OD₆₀₀ = 1 zu je 3 µl auf YNB-Platten, die mit einer Stickstoffquelle und einer Kohlenstoffquelle - entweder Glukose oder Ölsäure - versetzt worden. Die Platten wurden für zwei Tage bei 23 °C inkubiert. Für die Überexpressionen war der gezeigte Stamm Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ der Ausgangsstamm. Die Transformatanten wurden mittels Southern Blot (gezeigt sind Stämme mit zweifachen- oder mehrfachen Integrationen des Konstrukts) und Western Blot überprüft.

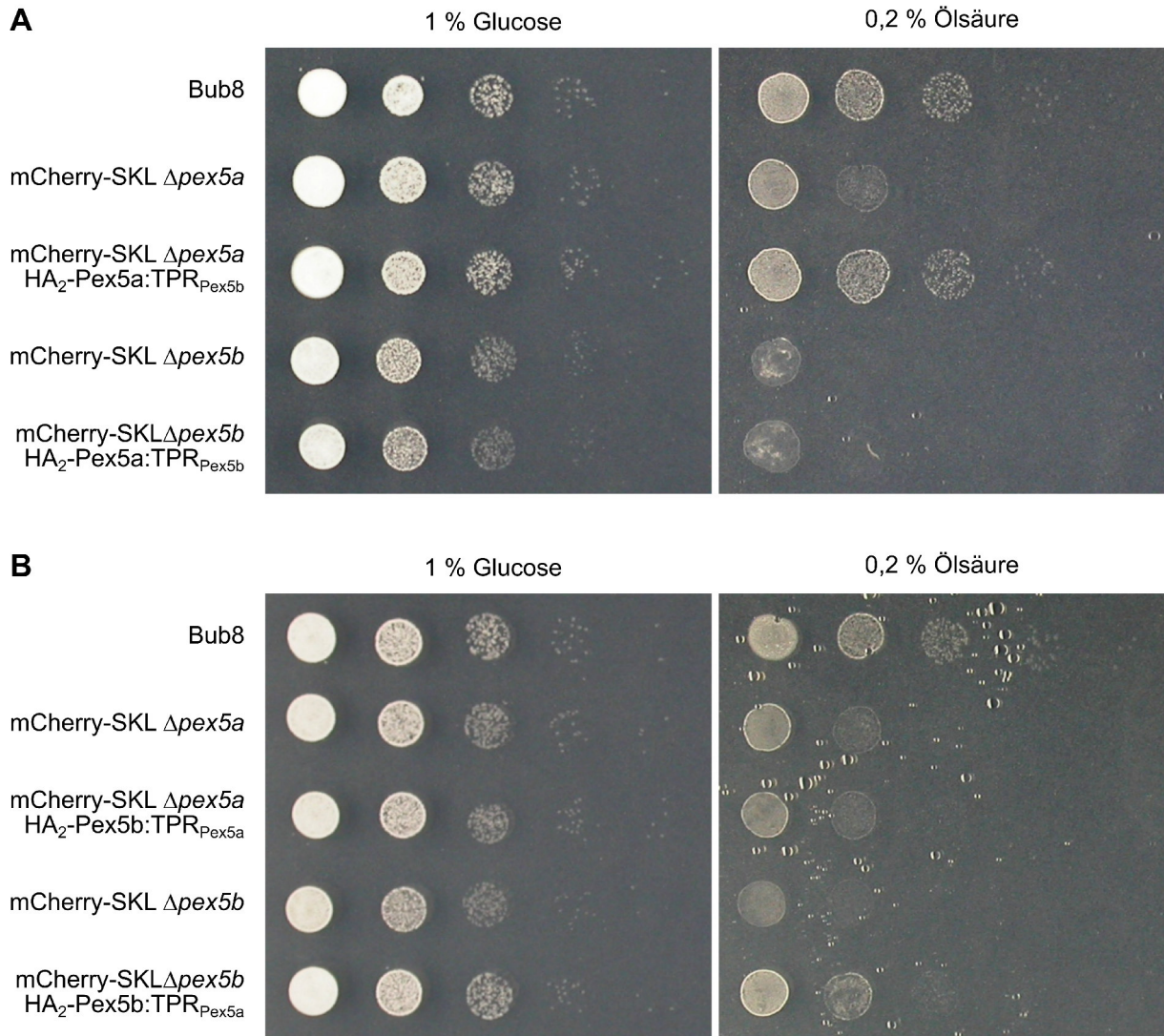


Abbildung 34: Überexpression von Pex5-Chimären.

In den Einzeldelentionsmutanten für *pex5a* oder *pex5b* wurden die chimären Pex5-Proteine (A) HA₂-Pex5a:TPR_{Pex5b} bzw. (B) HA₂-Pex5b:TPR_{Pex5a} unter dem *etef*-Promoter vom *sdh2*-Lokus überexprimiert. Gezeigt ist das Wachstum verschiedener Stämme nach zwei Tagen bei 23 °C. Die *U. maydis*-Zellen wurden in zehnfachen Verdünnungsstufen, beginnend mit OD₆₀₀ = 1, zu je 3 µl getropft. (A) HA₂-Pex5a:TPR_{Pex5b} kann den Deletionsphänotyp von *pex5a* unter Ölsäurebedingungen komplementieren, nicht jedoch den von *pex5b*. (B) Das chimäre Protein HA₂-Pex5b:TPR_{Pex5a} kann den Deletionsphanotyp von *pex5b* teilweise, nicht jedoch den von *pexa* komplementieren.

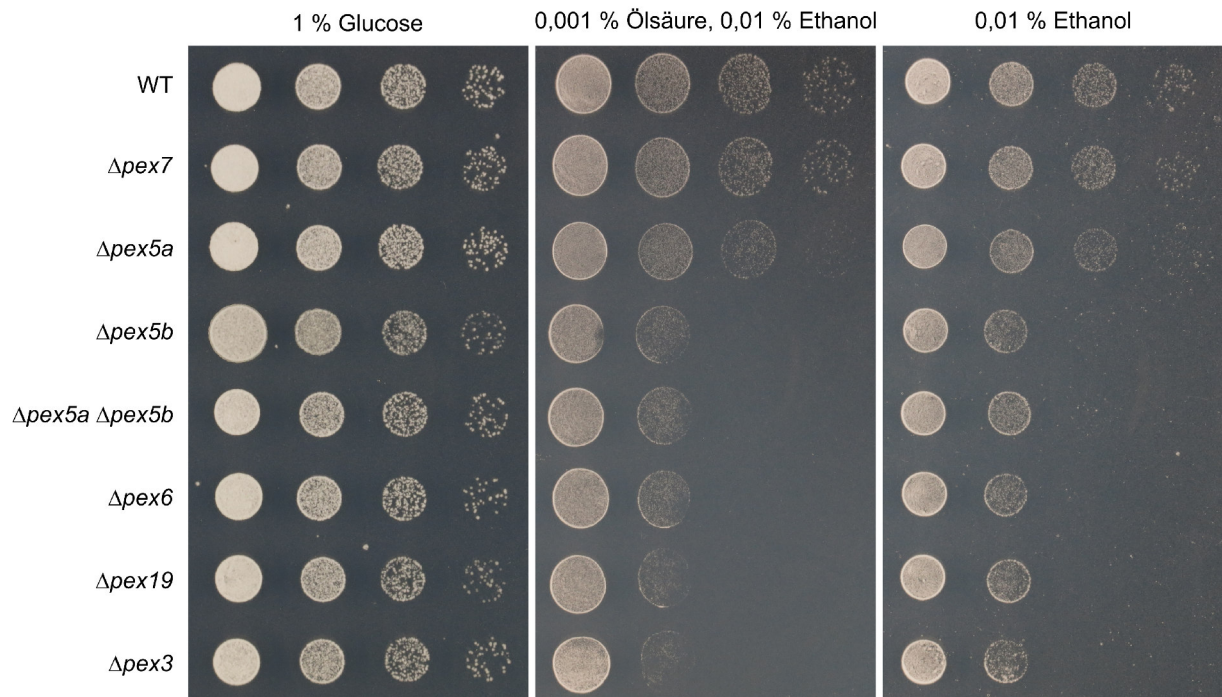


Abbildung 35: Wachstum verschiedener peroxisomaler Mutanten unter dem Einfluss von Ölsäure und Ethanol.

Die *U. maydis*-Stämme wurden ausgehend von $OD_{600} = 1$ in zehnfachen Verdünnungsstufen auf YNB-Agar-Platten, supplementiert mit Ammoniumsulfat und verschiedenen Kohlenstoffquellen, zu je 5 μ l getropft. Die Platten wurden nach zwei Tagen Inkubation bei 23 °C fotografiert. Peroxisomen-defekte Mutanten zeigen ein reduziertes Wachstum sowohl unter Ethanolbedingungen als auch wenn Ölsäure und Ethanol zur Verfügung stehen.

5 Material und Methoden

5.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

5.1.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden vorwiegend Chemikalien von der Qualität p.a. der Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) und Difco (Augsburg) verwendet.

5.1.2 Puffer und Lösungen

Standardlösungen und -puffer wurden nach Ausubel *et al.*, 1987 [268] oder Sambrook *et al.*, 1989 [269] hergestellt. Andere Puffer und Lösungen sind im Folgenden bei der jeweiligen Methode aufgeführt. Lösungen und Puffer wurden bei Bedarf entweder autoklaviert (20 min, 121 °C) oder steril filtriert (Porengröße: 0,2 µm).

5.1.3 Kits

Um Plasmide aus *E. coli* aufzureinigen, wurde das ZR Plasmid Miniprep™- Classic Kit von Zymo Research (Freiburg) genutzt. Zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten oder zur Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde das Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit von Avegene (Hamburg) verwendet. Radioaktives Labeling von DNA für Southern Blot wurde mit dem Megaprime Labeling Kit von Amersham (Braunschweig) oder dem DecaLabel DNA Labeling Kit von Thermo Scientific durchgeführt.

5.1.4 Enzyme

Name des Enzyms	Bezugsquelle
Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich
Lysozym	Roche
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific
KOD Xtreme™ Hot Start DNA-Polymerase	Millipore
Phusion Hot Start DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific, New England Biolabs
RNase A	AppliChem
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific

5.1.5 Antikörper

Um Proteine mit HA-Tag nachzuweisen, wurde der Antikörper anti-HA (Maus, monoklonal) von Sigma-Aldrich und anschließend ein sekundärer Antikörper (HRP-conjugated goat anti-mouse) von Santa Cruz verwendet.

5.1.6 Weitere Materialien

Material	Bezugsquelle
Blottingpapier	Roth (Karlsruhe)
Cryo-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Nylon-Membran	Amersham Pharmacia
Petrischalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
Storage Phosphor Screen	Amersham (Freiburg)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugen (Heraeus)	Thermo Fisher Scientific

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde unter Anwendung zweier verschiedener Methoden aus *E. coli* isoliert. Reichte eine schnelle und weniger saubere Präparation, zum Beispiel für eine Analyse mittels Restriktionsverdau, wurde die Plasmid-DNA mittels Destroyer-Lyse gewonnen (Björn Sandrock). Dafür wurden 1,5 ml einer 5 ml-Übernachtskultur bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl Destroyer-Lysis-Puffer resuspendiert. Inkubation erfolgte bei RT für 5 min auf dem Vbrax. Nach anschließendem Hitzeschock für 1 min bei 95 °C wurden die Reaktionsgefäße für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 8 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und 5-10 µl des Überstandes für die Restriktionsanalyse verwendet.

Sollte mit Plasmiden weiter gearbeitet, beispielsweise kloniert werden, wurde für die Aufreinigung das ZR Plasmid MiniprepTM-Kit von Zymo Research verwendet.

Destroyer-Lysis-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

15 % (w/v) Saccharose

2 mg/ml Lysozym

200 µg/ml RNase A

100 µg/ml BSA

5.2.2 Isolation genomischer DNA aus den Pilzen *S. cerevisiae* und *U. maydis*

Um genomische DNA aus *U. maydis* oder *S. cerevisiae* zu gewinnen, wurden 2-3 ml von 3-5 ml einer Übernachtskultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 0,3 g Glasbeads, 500 µl Lysis-Puffer und 500 µl Phenol/Chloroform hinzupipettiert. Die Arbeiten erfolgten ab Zugabe von Phenol/Chloroform unter dem Abzug unter Verwendung geeigneter Schutzkleidung. Um die Zellen aufzubrechen wurden diese in den Reaktionsgefäßen für 10-15 min schüttelnd auf dem Vibrax inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm bilden sich verschiedene Phasen, wobei sich die DNA in der wässrigen Phase befindet. Von der oberen, wässrigen Phase wurden 400 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 96 % Ethanol überführt. Nach kräftigem Schütteln wurden die Ansätze für 5 min bei RT oder auf Eis inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10-15 min pelletiert und anschließend mit 96 % und 70 % Ethanol gewaschen. Nach Abnahme und Verdunsten des restlichen Ethanols bei RT wurde das DNA-Pellet in 50 µl TE-RNase-Puffer gelöst.

Lysis-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 % (w/v) SDS
2 % (w/v) Triton X-100

Phenol/Chloroform:

50 % (v/v) Phenol
50 % (v/v) Chloroform

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
1 mM Na₂-EDTA

TE-RNase-Puffer:

50 µg/ml RNaseA
in TE-Puffer

5.2.3 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Um DNA an definierten Stellen zu schneiden wurden Restriktionsenzyme verwendet. Enzym-, Pufferkonzentrationen, Inkubationstemperaturen und -zeiten wurden nach Herstellerangaben angewandt. Auch bei Verdau der DNA mit zwei Enzymen wurde die Empfehlung des Herstellers herangezogen.

5.2.4 Dephosphorylierung von DNA

Um Selbstligation der Vektoren zu minimieren wurden die geschnittenen Plasmide nach Herstellerangabe mit der FastAP Thermosensitiven, alkalinen Phosphate für 10 min bei 37 °C inkubiert und danach mittels Hitze für 5 min bei 75 °C inaktiviert.

5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion [270, 271, 272] dient der Amplifikation von spezifischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Durch eine thermostabile Polymerase werden mit Hilfe von Primern und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Für alle PCR-Reaktionen wurde die Phusion oder KOD Xtreme™ Hot Start DNA-Polymerase verwendet. In einer PCR-Reaktion wird zuerst die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Im Annealing-Schritt bei 50-60 °C binden die Primer an die DNA-Einzelstränge. Die thermostabile Polymerase synthetisiert anschließend ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang. Durch eine erneute Denaturierung bei 95 °C beginnt der Zyklus erneut.

Phusion - Reaktionsansatz:

5 µl 10x PCR-Puffer
1 µl dNTPs (10 mM je Nukleotid)
0,5 µl 5'Primer (25 mM)
0,5 µl 3'Primer (25 mM)
100 ng Matrizen-DNA
2,5 U DNA-Polymerase
Wasser ad 50 µl

Phusion - PCR-Programm:

- 1) 10 min 95 °C (initiale Denaturierung)
- 2) 1 min 95 °C (Denaturierung)
- 3) 1 min 50-70 °C (Annealing, Temperatur abhängig von den verwendeten Primern)
- 4) X min 72°C (Elongation, 20 - 30 s pro kb) - 34x zu Schritt 2
- 5) 10 min 72°C (Auffüll-Reaktion)
- 6) Pause 14 °C

KOD - Reaktionsansatz:

25 µl 2x PCR-Puffer
10 µl dNTPs (2 mM)
1,5 µl 5'Primer (10 mM)
1,5 µl 3'Primer (10 mM)
1 - 300 ng template
1 U (1 µl) KOD
Wasser ad 50 µl

KOD - PCR-Programm:

- 1) 2 min 94 °C (initiale Denaturierung)
- 2) 10 s 98 °C (Denaturierung)
- 3) 30 s 50-65 °C (Annealing)
- 4) X min 68 °C (Elongation, 1 min pro kb) - 29x zu Schritt 2
- 5) Pause 4 °C

5.2.6 Annealing einzelsträngiger DNA-Stücke

DNA-Stücke kleiner als 80 bp wurden nicht via PCR vervielfältigt, sondern als Oligonukleotide bestellt. Die beiden Einzelstränge wurden zu einem Doppelstrang annealt, indem je 2 µl 100 µM Oligonukleotide in 16 µl Annealing-Puffer für 5 min aufgekocht (95 - 99 °C) und anschließend zur Abkühlung bei RT inkubiert wurden.

Annealing-Puffer

10 mM Tris pH 7,5 - 8,0
50 mM NaCl
1 mM EDTA

5.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurden diese in geeignetem Verhältnis, i.d.R. 1/10 Vektor und 9/10 zu inserierende(s) Fragment(e), in einem Reaktionsgefäß auf ein Endvolumen von 17,5 µl vereinigt und mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T₄-DNA-Ligase (1U/µl) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C.

5.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Ermittlung von DNA-Konzentrationen wurde die DNA im Vergleich zu Lambda-DNA mit bekannten Konzentrationen auf ein Agarosegel geladen und anschließend wurde die Konzentration unter UV-Licht abgeschätzt.

5.2.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurde eine Suspension von 0,8-1,5 % Agarose in TAE-Puffer aufgekocht. Nach Herunterkühlen auf 60 °C wurde die Suspension mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm eingegossen. Nach Erstarren des Gels und Entfernen des Kammes und Schlittens wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte, horizontale Gelkammer gelegt. Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurden mit 1/6 Vol 6x Auftragspuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 80-130 V. Als Größenstandard wurde der Generuler™ DNA Ladder Mix der Firma Fermentas verwendet. Zur Dokumentation wurden die DNA-Banden durch UV-Licht (304 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

TAE-Laufpuffer:

40 mM Tris/HCl pH 8,3
20 mM Natriumacetat
2 mM EDTA

DNA-Auftragspuffer:

0,2 % (w/v) Orange G
50 % (w/v) Saccharose
1 mM EDTA

5.2.10 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA mithilfe eines Gel/PCR Fragment Extraktions-Kits den Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt.

5.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden erfolgte nach der Kettenabbruchmethode [273]. Durchgeführt wurden die Sequenzierungen von der Firma Eurofins MWG Operon und die eingeschickten Ansätze entsprachen den Empfehlungen der Firma.

5.2.12 Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Die Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten definierter Größe und Sequenz erfolgte mittels Southern Blotting Methode [274]. Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente werden dabei auf eine Nylonmembran übertragen und können durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen werden. Dafür wurde chromosomale DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert. Das Gel wurde anschließend für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und danach für 20 min in 0,4 N NaOH inkubiert. Zur Übertragung der DNA auf die Nylonmembran wurde eine Glasplatte über ein Bassin mit 0,4 N NaOH gelegt und quer über diese ein Streifen in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier so aufgelegt, dass beide Enden ins Vorratsbassin eintauchten. Anschließend wurde das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten aufgelegt, gefolgt von der mit Transferpuffer benetzten Nylonmembran und drei Schichten in Puffer getränkten Blotting-Papiers. Um die aufwärtsgerichteten Kapillarkräfte zu unterstützen wurde eine dicke Schicht saugfähiges Papier aufgelegt und die Konstruktion mit einem Gewicht von 300-500 g beschwert. Das Gel wurde für 2 h oder über Nacht geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) im Stratalinker 2400 (Stratagene) an der Membran fixiert. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert [275]. Dafür wurde die Membran für 20 min bei 60 °C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer inkubiert, die Sonde für 5 min bei 95 °C denaturiert, zum Hybridisierungspuffer mit Membran zugegeben (Endkonzentration etwa 106 cpm/ml) und bei 60 °C über Nacht inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal in 15 ml Southern-Waschpuffer für 20 min gewaschen, in Plastikfolie eingeschweißt und, je nach Aktivität der Sonde, für 2 h oder bis zu zwei Tage in einer Phosphorimager Kassette (Amersham) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm860, Amersham).

Depurinierungs-Lösung:

0,25 M HCl

Transfer-Lösung:

0,4 M NaOH

Hybridisierungspuffer:

7 % (w/v) SDS

500 mM Natriumphosphat Puffer
pH 7,0

Waschpuffer:

1 % (w/v) SDS
100 mM Natriumphosphat Puffer
pH 7,0

5.2.13 Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Zur Herstellung radioaktiver Sonden wurde anfangs das Megaprime Labeling System Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet. 25 ng Sonden-DNA mit einer Länge von 400-1000 bp und 5 µl der Primer-Lösung (Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz) wurden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 33 µl gebracht und im Heizblock bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 10 µl Reaktionspuffer (Puffersubstanzen und alle dNTPs außer dCTP), 2 µl Klenow Polymerase und 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zugegeben. Inkubation dieses Ansatzes erfolgte für 20 min bei 37 °C. Die Sonde wurde anschließend mittels einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation von überschüssigen Nukleotiden gereinigt, nochmals aufgekocht (10 min bei 99 °C) und anschließend zur Membran, auf die mittels Southern Blot-Methode DNA-Fragmente übertragen wurden, gegeben.

Wurde das DecaLabel DNA Labeling Kit von Thermo Scientific verwendet, wurden 100 ng Sonden-DNA zusammen mit 10 µl 5x Puffer und destilliertem Wasser auf ein Volumen von 41 µl gebracht, für 5-10 min aufgekocht und anschließend zum Abkühlen auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Mix C, 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und 1 µl Klenow wurde der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 µl dNTPs und erneute Inkubation bei 37 °C für 5 min. Aufgereinigt wurde auch hier mittels Mobitec Säulchen und nach Inkubation der aufgereinigten Sonde bei 95 °C für 10 min wurde diese zur Membran im Hybridisierungspuffer gegeben.

5.3 Kultivierung von Mikroorganismen

5.3.1 Kultivierung von *E. coli*

In Flüssigkultur wurde *E. coli* in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37 °C auf einem Reagenzglasroller angezogen. Bei Verwendung von Ampicillin (Amp) wurde eine Konzentration von 100 µg/ml und bei Kanamycin (Kan) 50 µg/ml eingesetzt. Kultivierung auf Festmedium (dYT-Agar) erfolgte unter gleichen Selektionsbedingungen.

dYT-Medium

16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar für Festmedium
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren

5.3.2 Kultivierung von *U. maydis*

In Flüssigkultur wurde *U. maydis* in der Regel in YEPS-L angezogen. Sollte der Einfluss von verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht werden, wurde das Mangelmedium YNB verwendet und mit entsprechenden Nährstoffquellen versetzt. Die Kulturen wurden über einen definierten Zeitraum oder über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 30 °C in Reagenzgläsern in einem Reagenzglasroller oder in Schikanekolben auf einem Schüttler (160-200 rpm) inkubiert. Die Kultivierung auf Festmedium erfolgte auf verschiedenen Agarplatten. Sollte *U. maydis* angezogen werden, erfolgte die Kultivierung auf PD-Agar, bei Bedarf versetzt mit Antibiotika. Nach Transformation wurde Regenerationsagar verwendet, der mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt wurde. Der Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen wurde auf YNB-Agar untersucht. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurde eine Übernachtskultur zu gleichem Anteil mit NSY-Glycerin-Medium vermischt und in einem Cryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

YEPS-L-Flüssigmedium

4 g Hefeextrakt
4 g Pepton
2,0 % (w/v) Saccharose
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren

YNB-Medium

1,7 g Yeast Nitrogen Base
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren
pH 5,6

YNB-Mangelmedium wurde mit einer Kohlenstoffquelle (1-2 % (w/v) Glukose, 0,2 % (v/v) Fettsäure: Myristinsäure, Myristinsäure-methylester, Ölsäure oder Linolsäure) und einer Stickstoffquelle (0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat) versetzt.

Für YNB-Festmedium wurde vorm Autoklavieren 2 % (w/v) Bactoagar zugegeben.

PD-Festmedium

24 g Potato Dextrose Broth
15 g Agar
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren

Regenerations-Agar

10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
2,0 % (w/v) Saccharose
182,2 g Sorbitol
15 g Agar
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren

NSY-Glycerin-Medium

0,8 % (w/v) Nutrient Broth
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) Saccharose
80 % (w/v) Glycerin
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren

5.3.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden bei 30 °C inkubiert und Flüssigkulturen wurden entweder in Reagenzgläsern in einem Reagenzglasroller oder in Kolben auf einem Schüttler bei 160-200 rpm inkubiert. *S. cerevisiae* WT-Stämme oder Mutanten, deren Selektion mittels Antibiotika (Nourseothricin, 100 µg/ml) erfolgte, wurden in YPD-Medium angezogen. Bei Selektion über Auxotrophiemarker erfolgte die Anzucht in SC-Medium, dem die entsprechenden Aminosäuren fehlten. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurde eine Übernachtskultur zu gleichem Anteil mit NSY-Glycerin-Medium vermischt und in einem Cryo-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

YPD-Medium

10 g Hefe-Extrakt
20 g Bacto-Pepton
20 g Bactoagar für Festmedium
in 960 ml Aqua dest lösen
autoklavieren
2 % Glukose zugeben

Synthetic-Complete-Medium (SC)

Dropout-Mix, -His -Leu -Ade -Trp -Ura -Met
jeweils 2,0 g Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Inositol, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin
0,2 g para-Aminobenzoesäure
Für SC-Medium:
0,17 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren
0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat
0,0147 % (w/v) Dropout-Mix
2 % (w/v) Bactoagar für Festmedium
Je nach Selektionsmarker wurde zusätzlich zugegeben:
0,04 % (w/v) L-Histidin
0,01 % (w/v) Adenin
0,04 % (w/v) Tryptophan
0,08 % (w/v) g Leucin
0,04 % (w/v) Uracil
pH 5,6

für 20 min bei 121°C autoklavieren
0,04 % (w/v) Methionin und 2 % (w/v) Glukose wurden erst nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben

NSY-Glycerin-Medium

0,8 % (w/v) Nutrient Broth
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) Saccharose
80 % (w/v) Glycerin
in 1 l Aqua dest lösen
bei 121°C für 20 min autoklavieren

5.3.4 Bestimmung der optischen Dichte von Kulturen

Um in Flüssigkultur die Zelldichte zu ermitteln wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 550 oder 600 nm (OD_{550} oder OD_{600}) gemessen. Dabei wurden die Kulturen auf Werte zwischen 0,2 und 0,8 verdünnt um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen. Als Referenz diente unbewachsenes Kulturmedium. *U. maydis*-Kulturen mit einer OD_{600} von 1,0 entsprechen 1×10^7 Zellen pro ml.

5.4 Mikrobiologische und genetische Methoden

5.4.1 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen und Transformation

E. coli-Zellen des Stammes Top 10 wurden auf dYT-Agar frisch ausgestrichen und anschließend 2x in 4 ml SOB -Mg-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Reagenzglasroller inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen in Schüttelkolben (2x) in 200 ml SOB -Mg-Medium überführt und bei 23 °C auf einem Schüttler (275 rpm) inkubiert bis eine OD_{550} von 0,3 erreicht wurde (entspricht $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (700-1000 g, 10-15', 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1/3 Vol (16,7 ml) CCMB 80 resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min bei 750-1000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspendieren der Zellen in 1/12 Vol (4,17 ml) CCMB 80 wurden die kompetenten Zellen sofort verwendet oder aliquotiert (75 µl in vorgekühlte 1,5 ml-Eppendorfgefäße) und bei -80 °C gelagert.

SOB -Mg-Medium:

2,0 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto Hefeextrakt
10,0 mM NaCl
2,5 mM KCl

SOB-Medium:

99 % SOB -Mg-Medium
20 mM $MgCl_2$ und $MgSO_4$

CCMB 80:

10 mM KOAc pH 7,0

80 mM CaCl₂·2H₂O

20 mM MnCl₂·4H₂O

10 % Glycerin

pH 6,4, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

Zu den kompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes Top 10 wurde nach Auftauen der Zellen auf Eis das gewünschte Plasmid (1 µl für eine Re-Transformation, 10 µl einer Ligation) hinzupipettiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis und für 1 min bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurden die *E. coli*-Zellen auf dYT-Agar, supplementiert mit entsprechendem Antibiotikum, ausplattiert.

5.4.2 Protoplastierung von *U. maydis*-Zellen und Transformation

Um *U. maydis*-Zellen transformieren zu können, müssen diese zuerst protoplastiert werden. Dafür wurden die Zellen zunächst in 50 ml YEPSL-Flüssigkultur bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0,5-1,5 angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (3500 rpm, 5 min, RT) pelletiert und das Zellsediment in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml SCS-Lysing-Enzyme-Lösung aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Waren ca. 70 % der Zellen protoplastiert, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2500 rpm, 10 min, 4 °C). Das Sediment wurde zweifach mit 10 ml SCS-Puffer und einmal mit eiskalter STC-Lösung gewaschen. Schließlich wurden die Protoplasten in 450 µl eiskalter STC-Lösung aufgenommen, zu 50-70 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

SCS-Puffer:

20 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5,8

1 M Sorbitol

SCS-Lysing Enzyme-Lösung:

10µg/ml Lysing Enzyme in SCS

STC-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

100 mM CaCl₂

1 M Sorbitol

Für die Transformation wurden die *U. maydis*-Protoplasten auf Eis aufgetaut und ca. 500 ng der zu transformierenden DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert, 500 µl STC/PEG zugegeben und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von PEG wird die Zellmembranen für DNA permeabel gemacht. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar ausplattiert, wobei dieser zuvor in zwei Schichten übereinander gegossen wurde: Die untere Schicht (10 ml) enthielt das Fungizid in zweifacher Konzentration und die obere Schicht (10 ml) war frei von Selektionsfaktoren. Durch Diffusion stellte sich so nach einem längeren Zeitraum die übliche Konzentration des Antibiotikums ein und ließ den Zellen Zeit für Regeneration. Die

Platten wurden bei 30°C inkubiert.

STC/PEG:

40 % (w/v) Polyethylenglycol in STC

Antibiotika-Konzentrationen:

Cbx-Stammlösung: 2 mg/ml (Methanol) - Endkonzentration: 4 µg/ml

Gent-Stammlösung: 200 mg/ml (Wasser) - Endkonzentration: 500 µg/ml

Hyg-Stammlösung: 426 mg/ml (Wasser) - Endkonzentration: 170 µg/ml

Nat-Stammlösung: 200 mg/ml (Wasser) - Endkonzentration: 200 µg/ml

5.4.3 Integration von Vektoren in den genomischen *sdh2*-Lokus

Der zur Integration von Vektorkonstrukten genutzte *sdh2*-Lokus in *U. maydis* wird oft *cbx*-Lokus genannt, da er Carboxinresistenz (*Cbx^R*) nach Integration spezieller Vektoren vermittelt. Diese Vektoren tragen ein Carboxinresistenz vermittelndes Allel des *sdh2*-Gens. Carboxin ist ein Fungizid, das die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase inhibiert. Das vektorkodierte Protein wird nicht durch das Fungizid inhibiert und vermittelt dadurch Carboxinresistenz. Der Vektor kann durch Verdau mit *SspI* in diesem Allel linearisiert und dadurch nach Transformation durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen Locus integrieren werden. Der *sdh2*-Lokus wird durch die Integration des Vektors verdoppelt und mehrfache Integration des transformierten Plasmids ist möglich. Die Anzahl der Integrationen kann mittels Southern Blot-Methode bestimmt werden.

5.4.4 (Teil-)Deletion oder teilweiser Austausch von Genfragmenten in *U. maydis*

Um Gene oder Genfragmente zu deletieren oder auszutauschen wurde eine Strategie nach Kämper, 2004 angewendet [276]. Mittels homologer Rekombination können DNA-Stücke mit ca. 1000 bp flankierenden und homologen Regionen zielgerichtet an einen bestimmten Ort im Genom integriert werden. Dabei können Gene oder Gen-Abschnitte durch Austausch dieses Gens gegen eine Resistenzkassette deletiert und die Zellen auf dieses Ereignis selektiert werden. Dabei wurde bei Teildeletionen im 3'-Bereich ein neues Stopp-Codon eingefügt. Genauso kann ein Genabschnitt gegen einen anderen ausgetauscht werden um im Folgenden chimäre Proteine zu exprimieren. Dies wurde erreicht, in dem der 3' liegende Abschnitt des Gens gegen einen anderen und eine Resistenzkassette mittels homologer Rekombination ausgetauscht wurde.

Die homologen Flanken wurden mittels PCR amplifiziert und nach *SfiI*-Verdau und unter Zugabe gleicher Menge *SfiI*-verdauter Resistenzkassette aneinander ligiert, wobei die Resistenzkassette von den zum Ziel-Lokus homologen Regionen flankiert wurde. Zur Amplifikation und Sequenzierung wurde das 3-Fragment-Ligations-Produkt in den Klonierungsvektor pJet2.1 (Fermentas) inseriert. Alle verwendeten Kassetten enthalten flankierende *SfiI*-Schnittstellen [277]. In den meisten Fällen wurde die DNA vor der Transformation mit *SspI* aus dem Vektor herausgeschnitten.

Die Transformanten wurden mittels Southern Blot und / oder Test-PCR auf Richtigkeit überprüft. Dabei wurde zum einen bestätigt, dass das Konstrukt an der richtigen Stelle im Genom integriert wurde und dass, im Falle von Deletionen, der ORF nicht mehr vorhanden war.

5.4.5 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *S. cerevisiae*

Eine YPD-Übernachtskultur von Hefe wurde auf $OD_{600} = 1,0$ in 20 ml YPD eingestellt und für sechs Stunden in einem Kolben bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 3 min) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen je einmal mit 0,5 Vol sterilem Wasser und 0,1 Vol sterilem SORB-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 180 µl SORB-Puffer und 20 µl Carrier-DNA resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder direkt verwendet.

Nach Zugabe von Plasmid-DNA oder eines PCR-Produkts wurde die Suspension durch Anschnipsen des Reaktionsgefäßes gemischt. Anschließend wurden 300 µl PEG-Puffer zugegeben, erneut gemischt und bei RT für 30 min und bei 42 °C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, 3 min) und mit YPD gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl YPD resuspendiert und die Zellen auf eine Selektionsplatte ausgestrichen oder, wenn Regeneration notwendig war, in 1 ml YPD für vier bis sechs Stunden auf einem Rotator inkubiert und erst anschließend ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

SORB-Puffer:

100 mM Lithiumazetat
10 mM TRIS
1 mM EDTA
1 M Sorbitol
pH 8,0

PEG-Puffer:

100 mM Lithiumazetat
10 mM TRIS
1 mM EDTA
40 % (w/v) PEG3350 (1000)
pH 8,0

5.5 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

5.5.1 *Escherichia coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieser weist folgenden Genotyp auf: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*.

5.5.2 *Ustilago maydis*-Stämme

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet. Von den Deletionsmutanten wurden mindestens zwei aber meistens mindestens drei unabhängige Mutanten phänotypisch charakterisiert. Wenn im Text vermerkt, wurde von den Stämmen mit Integrationen in den *sdh2*-Lokus die Integrationshäufigkeit mittels Southern Blot-Methode bestimmt. Einige der Stämme stammen aus der betreuten Bachelor- oder Masterarbeit von Domenica Martorana. Angegeben sind auch die Nummern in der internen Stammsammlung.

Tabelle 6: **Verwendete *U. maydis*-Stämme**

Abkürzungen für Organismen: A.n., *Aspergillus nidulans*, B.c., *Botrytis cinerea*, C.a., *Candida albicans*, H.s., *Homo sapiens*, P.b., *Phycomyces blakesleeanus*, P.m., *Penicillium marneffe*

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8	<i>a2 b4</i>	—	Laborsammlung
Bub8 mCherry-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i>	Hyg	[130], diese Arbeit (JA#201-204)
Bub8 PTS2-GFP	<i>a2 b4 cbx^R[Potef:PTS2-egfp]cbx^S</i>	Cbx	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung (JA#227/249)
Bub8 mCherry-SKL PTS2-GFP	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:PTS2-egfp]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung (JA#224f/254)
Bub8 $\Delta pex7$	<i>a2 b4 \Delta pex7</i>	Nat	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung (JA#260-263)
Bub8 $\Delta pex7$ mCherry-SKL	<i>a2 b4 \Delta pex7 Potef:mcherry-SKL</i>	Nat, Hyg	diese Arbeit (JA#1263f)
Bub8 $\Delta pex7$ PTS2-GFP	<i>a2 b4 \Delta pex7 cbx^R[Potef:PTS2-egfp]cbx^S</i>	Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1261f)
Bub8 $\Delta pex7$ mCherry-SKL PTS2-GFP	<i>a2 b4 \Delta pex7 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:PTS2-egfp]cbx^S</i>	Nat, Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1301-1303)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL \Delta pex5a</i>	Hyg, Nat	[130]
Bub8 $\Delta pex5a$ mCherry-SKL PTS2-GFP	<i>a2 b4 \Delta pex5a Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:PTS2-egfp]cbx^S</i>	Nat, Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#406f)
Bub8 $\Delta pex5b$	<i>a2 b4 \Delta pex5b</i>	Nat	diese Arbeit (JA#1011-1014)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL \Delta pex5b</i>	Hyg, Nat	diese Arbeit (JA#383f)
Bub8 $\Delta pex5b$ mCherry-SKL PTS2-GFP	<i>a2 b4 \Delta pex5b Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:PTS2-egfp]cbx^S</i>	Nat, Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#414)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ HA-Pex5b ²⁻⁵⁴⁴	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL \Delta pex5a cbx^R[Potef:HA-pex5b²⁻⁵⁴⁴]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1081)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ HA-Pex5b ²⁻⁵⁴⁴	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL \Delta pex5b cbx^R[Potef:HA-pex5b²⁻⁵⁴⁴]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#920f)
Bub8 $\Delta pex5b$ mCherry-SKL PTS2-GFP HA-Pex5b ²⁻⁵⁴⁴	<i>a2 b4 \Delta pex5b Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:PTS2-egfp, Potef:HA-pex5b²⁻⁵⁴⁴]gent^Rcbx^S</i>	Nat, Hyg, Cbx, Gent	diese Arbeit (JA#886-888)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ $\Delta pex5b$	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $\Delta pex5b$	Hyg, Nat	[130]
Bub8 $\Delta pex19$	a2 b4 $\Delta pex19$	Nat	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung (JA#275)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex19$	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex19$	Hyg, Nat	diese Arbeit (JA#1275-1277)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex3$	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex3$	Hyg, Gent	diese Arbeit (JA#1278f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ HA ₂ -Pex5a	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5a] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#849f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ HA ₂ -Pex5b	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5b] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1042-1045)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ HA ₂ -Pex5b	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5b] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#862)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ HA ₂ -Pex5a:TPR _{Pex5b}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5a-TPR _{Pex5b}] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#912f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ HA ₂ -Pex5a:TPR _{Pex5b}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5a-TPR _{Pex5b}] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#916f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ HA ₂ -Pex5b:TPR _{Pex5a}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5b-TPR _{Pex5a}] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#872)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ HA ₂ -Pex5b:TPR _{Pex5a}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:HA ₂ -pex5b-TPR _{Pex5a}] cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#875f)
Bub8 P _{pex5a:pex5b}	a2 b4 cbx^S [Ppex5a:pex5b] $gent^R$ cbx^S [1x]	Gent	diese Arbeit (JA#1174-1176)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ P _{pex5a:pex5b}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^S [Ppex5a:pex5b] $gent^R$ cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1177)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ P _{pex5a:pex5b}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^S [Ppex5a:pex5b] $gent^R$ cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1180f)
Bub8 P _{pex5b:pex5a}	a2 b4 cbx^S [Ppex5b:pex5a] $gent^R$ cbx^S [1x]	Gent	diese Arbeit (JA#1165-1167)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ P _{pex5b:pex5a}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^S [Ppex5b:pex5a] $gent^R$ cbx^S [1x]	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1169)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ $P_{pex5b:pex5a}$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ $cbx^R[P_{pex5b:pex5a}]gent^R cbx^S[1x]$</i>	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1173)
Bub8 mCherry-SKL $pex5b\Delta TPR$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5b\Delta TPR$</i>	Hyg, Gent	diese Arbeit (JA#967-972)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b\Delta TPR$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b\Delta TPR$</i>	Nat, Hyg, Gent	diese Arbeit (JA#1183f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5a:TPR_{pex5b}$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5a:TPR_{pex5b}$</i>	Hyg, Gent	diese Arbeit (JA#1047f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5b:TPR_{pex5a}$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5b:TPR_{pex5a}$</i>	Hyg, Gent	diese Arbeit (JA#1238f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b:TPR_{pex5a}$	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b:TPR_{pex5a}$</i>	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#989-993)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um00589}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um00589}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#519)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um00589}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um00589}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#520)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01329}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um01329}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#498f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um01329}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um01329}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#500)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01438}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um01438}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung (JA#616/525-627)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um01438}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um01438}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung (JA#612-615)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01540}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um01540}]cbx^S$</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#505)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um01540}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01540}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#506)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um03299}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um03299}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um03299}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um03299}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#393)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um04744}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um04744}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#528)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um04744}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um04744}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#529)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um05230}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#490f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um05230}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#524/1283f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um05230}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#525)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um06153}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um06153}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#530)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um06153}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um06153}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#531)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um06507}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um06507}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#549)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um06507}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um06507}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#550)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um10538}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um10538}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#509)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um10538}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um10538}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#510)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um10797}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um10797}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#507)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um10797}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um10797}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#508)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um11161}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um11161}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#501)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um11161}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um11161}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#502)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um11953}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um11953}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#526)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{um11953}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{um11953}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#527)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{gapdA.n.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{gapdA.n.}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{gapdA.n.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{gapdA.n.}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#415)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{gapdB.c.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{gapdB.c.}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{gapdB.c.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ <i>cbx^R[Potef:egfp-PTS1_{gapdB.c.}]<i>cbx^S</i></i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#410)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{gapdC.a.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapdC.a.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{gapdC.a.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapdC.a.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#395/409)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{pgk1H.s.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgk1H.s.}] cbx^S	Hyg, Cbx	[130] (JA#172f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{pgk1H.s.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgk1H.s.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#351f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{pgk1H.s.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgk1H.s.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1252)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{pgk2H.s.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgk2H.s.}] cbx^S	Hyg, Cbx	[130] (JA#176f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{pgk2H.s.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgk2H.s.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#353f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{pgk2H.s.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgk2H.s.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#418)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#95f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#349f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#385)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{pgkP.m.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgkP.m.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1269f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5b$ GFP-PTS1 _{pgkP.m.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5b$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{pgkP.m.}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#417)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Shy1	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-um05230] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#582)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b\Delta$ TPR GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b\Delta$ TPR cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Nat, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1259f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5b\Delta$ TPR GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5b\Delta$ TPR cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1245f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5a$:TPR _{$pex5b$} GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5a$:TPR _{$pex5b$} cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1249-1251)
Bub8 mCherry-SKL $pex5b$:TPR _{$pex5a$} GFP-PTS1 _{gapd2P.b.}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5b$:TPR _{$pex5a$} cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{gapd2P.b.}] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1267f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b\Delta$ TPR GFP-PTS1 _{shy1}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ $pex5b\Delta$ TPR cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Nat, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1257f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5b\Delta$ TPR GFP-PTS1 _{shy1}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5b\Delta$ TPR cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1247f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5a$:TPR _{$pex5b$} GFP-PTS1 _{shy1}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5a$:TPR _{$pex5b$} cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1255f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5b$:TPR _{$pex5a$} GFP-PTS1 _{shy1}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5b$:TPR _{$pex5a$} cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um05230}] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1265f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um01966}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01966}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#422)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01966}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01966}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#492)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um02028}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um02028}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#476f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um02028}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um02028}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#688)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um02208}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um02208}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1116f)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um02208}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um02208}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1118f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um06400}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um06400}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1124f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um06400}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um06400}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1126f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um01466}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01466}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1094f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01466}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01466}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1096f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um00122}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um00122}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1090f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um00122}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um00122}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1092f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um10665}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um10665}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1132f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um10665}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um10665}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1134f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um01747}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01747}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1102f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01747}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01747}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1104f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um02097}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um02097}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1112f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um02097}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um02097}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1114f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um11001}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um11001}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#421)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um11001}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um11001}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#494)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um10825}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um10825}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1136f)

Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um10825}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um10825}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1138f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um01986}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01986}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1108f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01986}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01986}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1110f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um11938}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um11938}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1140f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um11938}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um11938}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1142f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um01850}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01850}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1082f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01850}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01850}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1106f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um10273}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um10273}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1128f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um10273}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um10273}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1130f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um01599}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01599}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1098f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um01599}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um01599}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1100f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{um03158}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um03158}] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1120f)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-PTS1 _{um03158}	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-PTS1 _{um03158}] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1122f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um01966	a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R [Potef:egfp-um01966] cbx^S	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1235-1237)
Bub8 mCherry-SKL $\Delta pex5a$ GFP-Um01966	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $\Delta pex5a$ cbx^R [Potef:egfp-um01966] cbx^S	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1240f,1271f)
Bub8 mCherry-SKL $pex5a$:TPR _{pex5b} GFP-Um01966	a2 b4 Potef:mcherry-SKL $pex5a$:TPR _{pex5b} cbx^R [Potef:egfp-um01966] cbx^S	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1330f)

Bub8 mCherry-SKL <i>pex5b</i> :TPR _{<i>pex5a</i>} GFP-Um01966	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL pex5b:TPR_{pex5a}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um01966]cbx^S</i>	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1332f)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a pex5b</i> :TPR _{<i>pex5a</i>} GFP-Um01966	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a pex5b:TPR_{pex5a}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um01966]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1344f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um01966-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um01966-SKL]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1358f)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a</i> GFP-Um01966-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um01966-SKL]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1348f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um01966-AAA	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um01966-AAA]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1352f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um10665	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um10665]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1229-1231)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a</i> GFP-Um10665	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a cbx^R[Potef:egfp-um10665]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1273f)
Bub8 mCherry-SKL <i>pex5a</i> :TPR _{<i>pex5b</i>} GFP-Um10665	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL pex5a:TPR_{pex5b}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um10665]cbx^S</i>	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1334f)
Bub8 mCherry-SKL <i>pex5b</i> :TPR _{<i>pex5a</i>} GFP-Um10665	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL pex5b:TPR_{pex5a}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um10665]cbx^S</i>	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1336f)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a pex5b</i> :TPR _{<i>pex5a</i>} GFP-Um10665	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a pex5b:TPR_{pex5a}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um10665]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1350f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um10665-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um10665-SKL]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1362f)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a</i> GFP-Um10665-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um10665-SKL]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1364f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um10665-AAA	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um10665-AAA]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1354f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um11001	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um11001]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1232-1234)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a</i> GFP-Um11001	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a cbx^R[Potef:egfp-um11001]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1242-1244, 1280-1282)

Bub8 mCherry-SKL <i>pex5a</i> :TPR _{<i>pex5b</i>} GFP-Um11001	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL pex5a:TPR_{pex5b}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um11001]cbx^S</i>	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1338f)
Bub8 mCherry-SKL <i>pex5b</i> :TPR _{<i>pex5a</i>} GFP-Um11001	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL pex5b:TPR_{pex5a}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um11001]cbx^S</i>	Hyg, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1340f)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a pex5b</i> :TPR _{<i>pex5a</i>} GFP-Um11001	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a pex5b:TPR_{pex5a}</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um11001]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Gent, Cbx	diese Arbeit (JA#1346f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um11001-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um11001-SKL]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1360f)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a</i> GFP-Um11001-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a</i> <i>cbx^R[Potef:egfp-um11001-SKL]cbx^S</i>	Hyg, Nat, Cbx	diese Arbeit (JA#1342f)
Bub8 mCherry-SKL GFP-Um11001-AAA	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL cbx^R[Potef:egfp-um11001-AAA]cbx^S</i>	Hyg, Cbx	diese Arbeit (JA#1356f)
Bub8 <i>um01966</i> -SKL	<i>a2 b4 um01966:SKL</i>	Gent	diese Arbeit (JA#1310-1312)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a um01966</i> -SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a um01966:SKL</i>	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1313-1315)
Bub8 <i>um10665</i> -SKL	<i>a2 b4 um10665:SKL</i>	Gent	diese Arbeit (JA#1285-1287)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a um10665</i> -SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a um10665:SKL</i>	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1316-1318)
Bub8 <i>um11001</i> -SKL	<i>a2 b4 um11001:SKL</i>	Gent	diese Arbeit (JA#1288-1291/1293)
Bub8 mCherry-SKL Δ <i>pex5a um11001</i> -SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL Δpex5a um11001:SKL</i>	Hyg, Nat, Gent	diese Arbeit (JA#1319-1321)

Tabelle 7: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
GFP-Sps19p	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::natNT2</i>	[130] (JA#1f)
$\Delta pex5$	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>pex5Δ::kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt
GFP-Sps19p $\Delta pex5$	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>pex5Δ::kanMX4</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::natNT2</i>	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#604f)
GFP-Sps19p $\Delta pex5$ UmPex5a	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>pex5Δ::kanMX4</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::natNT2</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}-um02528</i>]	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#691f)
GFP-Sps19p $\Delta pex5$ UmPex5b	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>pex5Δ::kanMX4</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::natNT2</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}-um10172</i>]	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#693f)
$\Delta pex18$	BY4742; <i>MATa</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>pex18Δ::kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt
$\Delta pex21$	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>pex21Δ::kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt
$\Delta pex18 \Delta pex21$	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>pex18Δ::nat2</i> ; <i>pex21Δ::kanMX4</i>	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#957f)
GFP-Sps19p $\Delta pex18 \Delta pex21$	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::natNT2</i> ; <i>pex18Δ::nat2</i> ; <i>pex21Δ::kanMX4</i>	diese Arbeit (JA#1185f)
GFP-Sps19p $\Delta pex18 \Delta pex21 \Delta pex5$	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::ura3</i> ; <i>pex18Δ::nat2</i> ; <i>pex21Δ::kanMX4</i> ; <i>pex5Δ::hphNT1</i>	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#1000f)
GFP-Sps19p $\Delta pex18 \Delta pex21 \Delta pex5$ UmPex5a	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::ura3</i> ; <i>pex18Δ::nat2</i> ; <i>pex21Δ::kanMX4</i> ; <i>pex5Δ::hphNT1</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}-um02528</i>]	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#691f)
GFP-Sps19p $\Delta pex18 \Delta pex21 \Delta pex5$ UmPex5b	BY4741; <i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>P_{ADH1}-GFP-SPS19::ura3</i> ; <i>pex18Δ::nat2</i> ; <i>pex21Δ::kanMX4</i> ; <i>pex5Δ::hphNT1</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}-um10172</i>]	D. Martorana, persönliche Mitteilung (JA#693f)

$\Delta pex9$	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>pex9</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt
GFP-Sps19p $\Delta pex9$	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex9</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	diese Arbeit (JA#1084f)
GFP-Sps19p $\Delta pex9 \Delta pex5$	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex9</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>pex5</i> Δ :: <i>hphNT1</i>	diese Arbeit (JA#1144f)
GFP-Sps19p $\Delta pex9 \Delta pex5$ UmPex5a	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex9</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>pex5</i> Δ :: <i>hphNT1</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -um02528]	diese Arbeit (#1191f)
GFP-Sps19p $\Delta pex9 \Delta pex5$ UmPex5b	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex9</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>pex5</i> Δ :: <i>hphNT1</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -um10172]	diese Arbeit (#1193f)
$\Delta pex8$	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>pex8</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt
GFP-Sps19p $\Delta pex8$	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex8</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	diese Arbeit (JA#1084f)
GFP-Sps19p $\Delta pex8 \Delta pex5$	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex8</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>pex5</i> Δ :: <i>hphNT1</i> ;	diese Arbeit (JA#1146f)
GFP-Sps19p $\Delta pex8 \Delta pex5$ UmPex5a	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex8</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>pex5</i> Δ :: <i>hphNT1</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -um02528]	diese Arbeit (#1195-1197)
GFP-Sps19p $\Delta pex8 \Delta pex5$ UmPex5b	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; <i>pex8</i> Δ :: <i>kanMX4</i> ; <i>pex5</i> Δ :: <i>hphNT1</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -um10172]	diese Arbeit (#1198f)
GFP-Sps19p RFP-PTS1 _{Pgk1Hs} (<i>Homo sapiens</i>)	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -RFP-PTS1 _{Pgk1Hs}]	diese Arbeit (#156f)
GFP-Sps19p RFP-PTS1 _{Pgk2Hs} (<i>H. sapiens</i>)	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -RFP-PTS1 _{Pgk2Hs}]	diese Arbeit (#1297f)
GFP-Sps19p RFP-PTS1 _{Gapdh2Pb} (<i>Phycomyces blakesleeanus</i>)	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -RFP-PTS1 _{Gapdh2Pb}]	[130] (JA#58f)
GFP-Sps19p RFP-PTS1 _{Shy1}	BY4741; MATa; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>P_{ADH1}</i> -GFP-SPS19:: <i>natNT2</i> ; [pCT320- <i>P_{ADH1}</i> -RFP-PTS1 _{Shy1}]	diese Arbeit (#1294-1296)

5.5.3 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Verwendet wurden die S288c-Derivate BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) und BY4742 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) ([278], Euroscarf). In diesen Stämmen wurden einzelne Gene deletiert. Als peroxisomaler Marker wurde das Protein Sps19p N-terminal mit GFP versehen [130]. Die Stämme wurden für die Expression von RFP-PTS1 mit Derivaten des Plasmids pCT320 transformiert, wodurch die Leucin-Auxotrophie komplementiert wurde. Einige Stämme wurden von Domenica Martorana in ihrer betreuten Masterarbeit generiert. Alle verwendeten Stämme sind in Tabelle 7 aufgeführt.

5.5.4 Plasmide und Oligonukleotide

In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 8: **Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Resistenz	Referenz
pBS-hhn	Amp; Hyg	[276]
pMF-1G	Amp, Kan; Gent	Michaela Wehr, persönliche Mitteilung
pMF-1N	Amp; Cbx	[277]
pJet2.1 mit Stuffer	Amp	Kay O. Schink, persönliche Mitteilung
$\Delta pex5b$ in pJet2.1	Amp; Cbx	[130]
p123	Amp; Cbx	[279]
PTS2-GFP in p123	Amp; Cbx	Domenica Martorana, persönliche Mitteilung
mCherry-SKL in pBS-hhn	Amp; Hyg	[130]
GFP-PTS1 _{GapdA.n.} in p123	Amp; Cbx	Masterarbeit Julia Ast (pJA11)
GFP-PTS1 _{GapdC.a.} in p123	Amp; Cbx	Masterarbeit Julia Ast (pJA13)
GFP-PTS1 _{Gapd2P.b.} in p123	Amp; Cbx	[130] (pJA37)
GFP-PTS1 _{Pgk1H.s.} in p123	Amp; Cbx	[130]/diese Arbeit (pJA75)
GFP-PTS1 _{Pgk2H.s.} in p123	Amp; Cbx	[130]/diese Arbeit (pJA86)
GFP-PTS1 _{PgkP.m.} in p123	Amp; Cbx	Masterarbeit Julia Ast (pJA55)
GFP-PTS1 _{um11161} in p123	Amp; Cbx	[130] (pJA35)
pSR103	Amp; Cbx	Stefanie Reißmann, persönliche Mitteilung
pCT320	Amp; Nat	[130, 280]
pKS133	Amp; Hyg	[281]
pYM-N9	Amp; Nat	Euroscarf, Frankfurt
RFP-PTS1 _{Gapdh2P.b.} in pCT320	Amp; Leu	[130] (pJA28)
RFP-PTS1 _{Pgk1H.s.} in pCT320	Amp; Leu	[130]/diese Arbeit (pJA74)
<i>UmPex5a</i> in pCT320	Amp; Leu	D. Martorana, persönliche Mitteilung
<i>UmPex5b</i> in pCT320	Amp; Leu	D. Martorana, persönliche Mitteilung

In dieser Arbeit erstellten Plasmide sind nachfolgend mit den verwendeten Oligonukleotiden aufgelistet. Die Sequenz der Oligonukleotide ist immer in 5'-3'-Richtung angegeben. Plasmide wurden sequenziert. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind blau markiert.

Deletions- und Insertionskonstrukte Für Deletionen, Teildeletionen oder Austausche wurden ca. 1000 bp homologe Flanken zu beiden Seiten einer Resistenzkassette und im Falle von Austauschen das einzubringende

Fragment ligiert. Anschließend wurden die Konstrukte in pJet2.1 zwischenkloniert und sequenziert.

$\Delta pex3$ - pJA214

Die Flanken wurden mit MI133, MI134, MI135 und MI136 vom Genom von Bub8 amplifiziert und über *Sfi*I an die Geneticin-Kassette aus pMF-1G und anschließend wurde das Konstrukt blunt in pJet2.1 ligiert.

MI133 ko pex3 lf fwd: atat**aatATT**CGACGTACATCTGCTTTGC

MI134 ko pex3 lf rev: atat**ggccatctaggcc**agttgtgacaagggccaagatgg

MI135 ko pex3 rf fwd: atat**GGCCTGAGTGGCC**agtaggtccaacgtctacgtg

MI136 ko pex3 rf rev: atat**aatATT**GCTCTCAAGACTGTCAAAGG

$\Delta pex5b$ - pJA117

Ausgangsplasmid war $\Delta pex5b$ in pJet [130]. Von diesem wurde über *Sfi*I die Resistenzkassette gegen Nat^R aus pMF-1N ausgetauscht.

$pex5b\Delta TPR$ - pJA225

Für das *knock out*-Konstrukt wurden die homologen Flanken vom Genom von Bub8 mit MI137, MI138, MI139 und MI140 amplifiziert und über *Sfi*I an die Geneticin-Resistenzkassette aus pMF-1G ligiert und anschließend blunt in pJet2.1 zwischenkloniert.

MI137 5b Δ TPR lf fwd: atat**aatATT**CATCCCAACGTCATCCCC

MI138 5b Δ TPR lf rev: atat**GGCCTGAGTGGCC**ttaGAAGCGGTAGACTGGCGCTGG

MI139 5b Δ TPR rf fwd: atat**GGCCATCTAGGCC**ccggtgtaacactgcgtgttgc

MI140 5b Δ TPR rf rev: atat**aatatt**tacctgTCAACGACGAGCG

$pex5a:TPR_{pex5b}$ - pJA228 / pJA230 / pJA231

Um am Locus von *pex5a* die C-terminale Domäne des Proteins auszutauschen, wurden homologe Flanken amplifiziert. Die linke Flanke wurde mit den Primern MI308 und MI309 vom Plasmid HA₂-Pex5a:TPR_{Pex5b} (pJA198) und die rechte Flanke vom Genom von Bub8 mit den Primern MI310 und MI311 amplifiziert. Die linke Flanke enthielt neben einer homologen Region den zweiten Teil des ORFs von *pex5b*. Die Flanken wurden über *Sfi*I an die Geneticin-Kassette aus pMF-1G ligiert und in pJet2.1 zwischenkloniert. Von dem erhaltenen Plasmid (pJA228) wurde die Resistenzkassette über *Sfi*I gegen die Hyg-Kassette aus pBS-hhn (pJA230) und die Nat-Kassette aus pMF-1N (pJA231) ausgetauscht.

MI308 3ab endo lf fwd: atat**aatatt**TTTCGACCTTCAAGCTATGCGC

MI309 3ab endo lf rev: atat**ggccatctaggcc**TTAATAATCGAATGGGACCTCACCCACACCCCC

MI310 3ab endo rf fwd: atat**ggcctgagtggcc**CACGCACGACGGCCAGTACATAGCG

MI311 3ab endo rf rev: atat**aatatt**GCGAACAGGCGTACACAGCGC

$pex5b:TPR_{pex5a}$ - pJA227 / pJA232

Um am Locus von *pex5b* die C-terminale Domäne auszutauschen, wurden homologe Flanken amplifiziert. Die linke Flanke wurde mit den Primern MI137 und MI307 vom Plasmid HA₂-Pex5b:TPR_{Pex5a} (pJA199) und die rechte Flanke vom Genom von Bub8 mit den Primern '5'rf pex5h(sfi1)' und '3'rf pex5h(ssp1)' (von Johannes Freitag) amplifiziert. Die linke Flanke enthielt neben einer homologen Region den zweiten Teil des ORFs von *pex5a*. Die Flanken wurden über *Sfi*I an die Geneticin-Kassette aus pMF-1G ligiert und in pJet2.1

zwischenkloniert. Von dem erhaltenen Plasmid (pJA227) wurde die Resistenzkassette über *Sfi*I gegen die Nat-Kassette aus pMF-1N (pJA232) ausgetauscht.

MI137 5bΔTPR lf fwd: ataatATTTCATCCCAACGTCATCCCC

MI307 3ba endo lf rev: ataggcctgagtggccTCAGAAGTCGAATCCTTCACCCC

5'rf pex5h(sfi1): ataggccatctaggccCCGGTGTAACTGCGTGT

3'rf pex5h(ssp1): ataatattACGACGAGCGTCCAAATCTCGC

um01966-SKL - pJA275

Die homologen Flanken wurden vom Genom von Bub8 mit MJ231, MJ232, MJ233 und MJ234 amplifiziert und über *Sfi*I mit der Geneticin-Resistenzkassette aus pMF-1G ligiert. Nach Zwischenklonierung in pJet2.1 wurde das Insertionskonstrukt mit MJ231 und MJ234 amplifiziert und das PCR-Produkt für die Transformation genutzt.

MJ231 01966-9SKL lf fwd: atataatATTTTGGCTGGTCGAAGGATGC

MJ232 01966-9SKL lf rev: ataggccatctaggccTTAGAGCTTGactgttacagctcgtccatgccgccgtAAGGTTGC-ACCTCTCGGCAGC

MJ233 01966-9SKL rf fwd: ataggcctgagtggccacggataccgattcgtctgcc

MJ234 01966-9SKL rf rev: atataatATTCATCCGTATGCAGAACG

um10665-SKL - pJA271

Die homologen Flanken wurden vom Genom von Bub8 mit MJ236, MJ237, MJ238 und MJ239 amplifiziert und über *Sfi*I mit der Geneticin-Resistenzkassette aus pMF-1G ligiert. Nach Zwischenklonierung in pJet2.1 wurde das Insertionskonstrukt mit MJ236 und MJ239 amplifiziert und das PCR-Produkt für die Transformation genutzt bzw. mit den Restriktionsenzymen *Sna*BI und *Bst*API aus dem Vektor geschnitten.

MJ236 10665-9SKL lf fwd: atataATATTTTCCGGTCGCAAGCGC

MJ237 10665-9SKL lf rev: ataggccatctaggccTTAGAGCTTGactgttacagctcgtccatgccgccgtGAACTTGC-TCTGAGGACCAACGAGC

MJ238 10665-9SKL rf fwd: ataggcctgagtggccgcaacgccggcgcaacaaatcc

MJ239 10665-9SKL rf rev: atataatattaactaacgtaaagttagttctgc

um11001-SKL - pJA271

Die homologen Flanken wurden vom Genom von Bub8 mit MJ241, MJ242, MJ243 und MJ244 amplifiziert und über *Sfi*I mit der Geneticin-Resistenzkassette aus pMF-1G ligiert. Nach Zwischenklonierung in pJet2.1 wurde das Insertionskonstrukt mit MJ241 und MJ244 amplifiziert und das PCR-Produkt für die Transformation genutzt.

MJ241 11001-9SKL lf fwd: atataatattgggtgaagatcgagATGCTGC

MJ242 11001-9SKL lf rev: ataggccatctaggccTTAGAGCTTGactgttacagctcgtccatgccgccgtCAGATTGC-TAGCTCTCGATCTTGC

MJ243 11001-9SKL rf fwd: ataggcctgagtggccttctgcaagcaggttgcgcaatc

MJ244 11001-9SKL rf rev: atataatattctccaccctgctgctgcc

Pex5-Konstrukte für die Expression vom *sdh2*-Lokus Für die Expression vom *sdh2*-Lokus wurde in p123 [279] kloniert oder in Derivate von diesem.

HA-GFP - pJA200

Es wurde der HA-Tag aus pSR103 mit MH975 und MH976 amplifiziert und das PCR-Produkt über *AgeI* und *XmaI* in p123 ligiert.

MH975 HA-Tag fwd *AgeI*: atat**accggt**atgTCGGGCGGCTATCCCTACG

MH976 HA-Tag rev *XmaI*: atat**cccg**gGTGGTCACGGCTTGTGATCC

HA₂-GFP - pJA195

Es wurde der HA-Tag aus pSR103 mit MH975 und MH976 amplifiziert und das PCR-Produkt über *AgeI* und *XmaI* zweifach hintereinander in p123 ligiert.

HA₂-Pex5a - pJA196

pex5a wurde vom Genom von Bub8 mit MH977 und MH781 amplifiziert und über *XmaI* und *MluI* in HA₂-GFP ligiert.

MH977-1.2 *pex5a* fwd: atat**cccg**gGCGTTTCAATCCATGCTCAACG

MH781-2 *pex5a* rev: atat**acgc**gtTCAGAAGTCGAATCCTTCACC

HA₂-Pex5b - pJA197

pex5b wurde vom Genom von Bub8 mit MH978 und MH783 amplifiziert und über *XmaI* und *MluI* in HA₂-GFP ligiert.

MH978-3.2 *pex5b* fwd: atat**cccg**gTCCGACCTTGTCTCGGGTGGC

MH783-4 *pex5b* rev: atat**acgc**gtggTTAATAATCGAATGGGACC

HA-Pex5b²⁻⁵⁴⁴ - pJA217 / pJA224

Die N-terminale Domäne von Pex5b wurde vom Genom von Bub8 mit MI026 und MI240 amplifiziert und über *XmaI* und *XbaI* in HA-GFP ligiert (pJA217). Um zusätzlich die Geneticinkassette einzubringen wurde das Plasmid mit *HpaI* aufgeschnitten und mit der *StuI*-verdauten Kassette aus pMF-1G ligiert (pJA224).

MI026 aa2 fwd *XmaI*: atat**cccg**gTCCGACCTTGTCTCGGGTGGC

MI240 aa544 rev *XbaI*: atat**tcta**gactaGAAGCGGTAGACTGGCGCTGG

HA₂-Pex5a:TPR_{Pex5b} - pJA198

Zuerst wurde vom Genom von Bub8 die N-terminale Domäne von *pex5a* mit MH977 und MH979 und die C-terminale Domäne von *pex5b* mit MH977 und MH783 amplifiziert. Beide Produkte wurden erneut als Templates in einer PCR Reaktion mit den Primern MH977 und MH783 eingesetzt. Anschließend wurde das Produkt über *XmaI* und *MluI* in HA₂-GFP ligiert.

MH977-1.2 *pex5a* fwd: atat**cccg**gGCGTTTCAATCCATGCTCAACG

MH979-13 Ch3ab Nrev: AGGATTGTCGCTGAGGTTGCCACCGTTGGCGAGCAGACG

MH980-14 Ch3ab Cfwd: GCCAACGGTGGCAACCTCAGCGACAATCCTTACATCGC

MH783-4 *pex5b* rev: atat**acgc**gtggTTAATAATCGAATGGGACC

HA₂-Pex5b:TPR_{Pex5a} - pJA199

Zuerst wurde vom Genom von Bub8 die N-terminale Domäne von *pex5b* mit MH978 und MH982 und die C-terminale Domäne von *pex5a* mit MH981 und MH781 amplifiziert. Beide Produkte wurden erneut als

Templates in einer PCR Reaktion mit den Primern MH978 und MH781 eingesetzt. Anschließend wurde das Produkt über *Xma*I und *Mlu*I in HA₂-GFP ligiert.

MH978-3.2 pex5b fwd: atatccggtTCCGACCTTGTCTCGGGTGGC

MH982-16 Ch3ba Nrev: GGCCGCATCTGACAAGAAGCGGTAGACTGGCGCTGG

MH981-15 Ch3ba Cfwd CCAGTCTACCGCTTCTTGTCAGATGCGGCCTTGCTC

MH781-2 pex5a rev: atatacgctTCAGAAGTCGAATCCTTCACC

P_{pex5a:pex5b} - pJA242

Zuerst wurde vom Genom von Bub8 der Promoter von *pex5a* mit MI777 und MI783 und der ORF von *pex5b* mit MI782 und MI781 amplifiziert. Beide Produkte wurden erneut als Templates in einer PCR Reaktion mit den Primern MI777 und MI781 eingesetzt. Anschließend wurde das Produkt über *Kpn*I und *Xba*I in p123 ligiert.

MI777 5a+ fw *Kpn*I: atatggtaccaagagacggaacatgtagg

MI783 P5a-5b rv ueh: GACAAGGTCGGACATcttgacggtgacgcttggtgg

MI782 P5a-5b fw ueh: agcgtcacgtcaagATGTCCGACCTTGTCTCGGG

MI781 5b+2 rv *Xba*I: atatctagaacgtacaacggcgagctcgc

P_{pex5b:pex5a} - pJA243

Zuerst wurde vom Genom von Bub8 der Promoter von *pex5b* mit MI779 und MI785 und der ORF von *pex5a* mit MI784 und MI778 amplifiziert. Beide Produkte wurden erneut als Templates in einer PCR Reaktion mit den Primern MI779 und MI778 eingesetzt. Anschließend wurde das Produkt über *Aat*II und *Xba*I in p123 ligiert.

MI779 5b+2 fw *Aat*II: atatgagtcTGGgtgagtacctggcagccc

MI785 P5b-5a rv ueh: GGATTGAAACGCCATggacatggtggccaccacgc

MI784 P5b-5a fw ueh: tggccacatgtccATGGCGTTTCAATCCATGCTC

MI778 5a+ rv *Xba*I: atatctagaacatcgacacatgtgtacca

GFP-Fusionen für die Expression vom *sdh2*-Lokus Für die Expression vom *sdh2*-Lokus wurde in p123 [279] kloniert oder in Derivate von diesem.

GFP-Um01966 - pJA261

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ158 und MJ159 amplifiziert und über *Mlu*I und *Not*I in p123 ligiert.

MJ158 GFP-01966 fwd *Mlu*I: atatACGCGTcATGTCGAACTCTGATCCAAAGG

MJ159 GFP-01966 rev *Not*I: atatgcggccgcCTAAAGTTTCGACCTCTCGGC

GFP-Um01966-SKL - pJA286

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ158 und MJ629 amplifiziert, wobei der reverse Primer vorm endogenen Stoppcodon ansetzt und in seiner Sequenz ein 12 Aminosäure-langes PTS1 mit einem neuen Stoppcodon aufweist. Das PCR-Produkt wurde über *Mlu*I und *Not*I in p123 ligiert.

MJ158 GFP-01966 fwd *Mlu*I: atatACGCGTcATGTCGAACTCTGATCCAAAGG

MJ629 01966+9SKL rev *NotI*: atatgcgccgcTTAGAGCTTGactgtacagctcgtccatgccgccggtAAGGTTTCG-ACCTCTCGGCAGCAGC

GFP-Um01966-AAA - pJA287

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ158 und MJ626 amplifiziert, wobei der reverse Primer vorm endogenen Stoppcodon ansetzt und in seiner Sequenz ein Triple-Alanin-Motiv gefolgt von einem Stoppcodon aufweist. Das PCR-Produkt wurde über *MluI* und *NotI* in p123 ligiert.

MJ158 GFP-01966 fwd *MluI*: atatACGCGTcATGTCGAACTCTGATCCAAAGG

MJ626 01966+AAA rev *NotI*: atatgcgccgcctaggcagcggcAAGGTTTCGACCTCTCGGCAGC

GFP-Shy1 (um05230) - pJA177

Der ORF von *um05230* wurde vom Genom von Bub8 mit MH615 und MH616 amplifiziert und über *MluI* und *XbaI* in p123 ligiert.

MH615 gfp-05230 fwd *MluI*: atatacgcgtaATGAGCTCCACTTCCACCTCC

MH616 gfp-05230 rev *XbaI*: atattctagaCTAGAGATTCTGTTGGATCCAC

GFP-Um10665 - pJA263

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ160 und MJ161 amplifiziert, das PCR-Produkt blunt in pJet2.1 zwischenkloniert und anschließend über *SacII* in p123 ligiert.

MJ160 GFP-10665 fwd *SacII*: atatCCGCGGccATGTCACAAGCCAAACTCACC

MJ161 GFP-10665 rev *SacII*: atatccgchgTCAGAACTTGCTCTGAGGACC

GFP-Um10665-SKL - pJA290

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ160 und MJ630 amplifiziert, wobei der reverse Primer vorm endogenen Stoppcodon ansetzt und in seiner Sequenz ein 12 Aminosäure-langes PTS1 mit einem neuen Stoppcodon aufweist. Das PCR-Produkt wurde blunt in pJet2.1 zwischenkloniert und anschließend über *SacII* in p123 ligiert.

MJ160 GFP-10665 fwd *SacII*: atatCCGCGGccATGTCACAAGCCAAACTCACC

MJ630 10665+9SKL rev *SacII*: atatccgchgTTAGAGCTTGactgtacagctcgtccatgccgccggtGAACTTGCT-CTGAGGACCAACGAG

GFP-Um10665-AAA - pJA285

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ160 und MJ627 amplifiziert, wobei der reverse Primer vorm endogenen Stoppcodon ansetzt und in seiner Sequenz ein Triple-Alanin-Motiv gefolgt von einem Stoppcodon aufweist. Das PCR-Produkt wurde über *SacII* in p123 ligiert.

MJ160 GFP-10665 fwd *SacII*: atatCCGCGGccATGTCACAAGCCAAACTCACC

MJ627 10665+AAA rev *SacII*: atatccgchgctaggcagcggcGAACTTGCTCTGAGGACCAACG

GFP-Um11001 - pJA262

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ162 und MJ163 amplifiziert und über *MluI* und *NotI* in p123 ligiert.

MJ162 GFP-11001 fwd *MluI*: atatACGCGTgATGCTGCTACCCACTCCAACG

MJ163 GFP-11001 rev *NotI*: atatgcgccgcTTACAGATTGCTAGCTCTCGATCTTGC

GFP-Um11001-SKL - pJA288

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ162 und MJ631 amplifiziert, wobei der reverse Primer vorm endogenen Stoppcodon ansetzt und in seiner Sequenz ein 12 Aminosäure-langes PTS1 mit einem neuen Stoppcodon aufweist. Das PCR-Produkt wurde über *MluI* und *NotI* in p123 ligiert.

MJ162 GFP-11001 fwd *MluI*: atatACGCGTgATGCTGCTACCCACTCCAACG

MJ631 11001+9SKL rev *NotI*: atatgcggccgcTTAGAGCTTGactgtacagctcgtccatgccgccggtCAGATTGCTAG-CTCTCGATCTTGC

GFP-Um11001-AAA - pJA289

Der ORF von *um01966* wurde vom Genom von Bub8 mit MJ162 und MJ628 amplifiziert, wobei der reverse Primer vorm endogenen Stoppcodon ansetzt und in seiner Sequenz ein Triple-Alanin-Motiv gefolgt von einem Stoppcodon aufweist. Das PCR-Produkt wurde über *MluI* und *NotI* in p123 ligiert.

MJ162 GFP-11001 fwd *MluI*: atatACGCGTgATGCTGCTACCCACTCCAACG

MJ628 11001+AAA rev *NotI*: atatgcggccgcctaggcagcggcCAGATTGCTAGCTCTCGATCTTGC

GFP-PTS1-Fusionen für die Expression vom *sdh2*-Lokus Für die Expression vom *sdh2*-Lokus wurde in p123 [279] kloniert. Es wurden Oligonukleotide bestellt, miteinander annealt und über *MluI* und *XbaI* in den p123 ligiert.

GFP-PTS1_{um00122} - pJA247

MJ006 um00122 PTS1 5': cgcgtaTGGACTCAGGGAAGCGGTGACGTGAAAAGCCACTTGTAGt

MJ007 um00122 PTS1 3': ctagaCTACAAGTGGCTTTTCACGTCACCGCTTCCCTGAGTCCAta

GFP-PTS1_{um00589} - pJA155

MH182 um00589 PTS1 5': cgcgtaGAGCTTAAGAATGGCGGTCACGTCAAGGCTAACATCTGAt

MH183 um00589 PTS1 3': ctagaTCAGATGTTAGCCTTGACGTGACCGCCATTCTTAAGCTCta

GFP-PTS1_{um01329} - pJA100

MG482 5' idh1 U: cgcgtaACGCACGAGTTCACCCAGGCCGTCCTCTCCAACCTCTGAt

MG483 3' idh1 U: ctagaTCAGAGGTTGGAGAGGACGGCCTGGGTGAACTCGTGCGTta

GFP-PTS1_{um01438} - pJA171

MH466 um01438 PTS1 5': cgcgtaACGATCATCGTCCAGTGCTGTACATTGCTTCACTTTAGt

MH467 um01438 PTS1 3': ctagaCTAAAGTGAAGCAATGTGACAGCACTGGACGATGATCGTta

GFP-PTS1_{um01466} - pJA248

MJ008 um01466 PTS1 5': cgcgtaCAGGCGTTGAGGATGATGCCTGAAAACGCTCGTTTGTAAt

MJ009 um01466 PTS1 3': ctagaTTACAAACGAGCGTTTTTCAGGCATCATCTCAACGCCTGta

GFP-PTS1_{um01540} - pJA153

MH192 um01540 PTS1 5': cgcgtaACTCACACTGCCGAGCTGACGCGCAGAGCAAATCTATAGt

MH193 um01540 PTS1 3': **ctaga**CTATAGATTTGCTCTGCGCGTCAGCTCGGCAGTGTGAGT**ta**

GFP-PTS1_{um01599} - pJA249

MJ010 um01599 PTS1 5': **cgcgta**TTCGAAAACATCGCCGCTGGCGCACGTCACAAGCTCTG**at**

MJ011 um01599 PTS1 3': **ctaga**TCAGAGCTTGTGACGTGCGCCAGCGGCGATGTTTTCGAA**ta**

GFP-PTS1_{um01747} - pJA250

MJ012 um01747 PTS1 5': **cgcgta**GTTGCCAACGATGACGTGGCTCGCTTTGCCAAGCTCTAA**t**

MJ013 um01747 PTS1 3': **ctaga**TTAGAGCTTGGCAAAGCGAGCCACGTCATCGTTGGCAAC**ta**

GFP-PTS1_{um01850} - pJA251

MJ014 um01850 PTS1 5': **cgcgta**AACGAGGTCAAGAAGATGTCCAGGGTTGCAAAGCTCTAG**t**

MJ015 um01850 PTS1 3': **ctaga**CTAGAGCTTTGCAACCCTGGACATCTTCTTGACCTCGTT**ta**

GFP-PTS1_{um01966} - pJA131

MG940 um01966 PTS1 5': **cgcgta**CCCATGCTCAAGGCTGCTGCCGAGAGGTGCAACCTTTAG**t**

MG941 um01966 PTS1 3': **ctaga**CTAAAGGTTGACCTCTCGGCAGCAGCCTTGAGCATGGG**ta**

GFP-PTS1_{um01986} - pJA252

MJ016 um01986 PTS1 5': **cgcgta**AGCAAGCAGTTCTCCGATTACCTACCCGCCGACCTTTG**at**

MJ017 um01986 PTS1 3': **ctaga**TCAAAGGTCGGCGGGTAGGTAATCGGAGAACTGCTTGCT**ta**

GFP-PTS1_{um02028} - pJA146

MH064 5' um02028: **cgcgta**GGAGAAGCAGTGCCATTCACTGAACGGGCGAGGTTGTG**at**

MH063 3' um02028: **ctaga**TCACAACCTCGCCCGTTCACTGAATGGCACTGCTTCTC**ta**

GFP-PTS1_{um02097} - pJA253

MJ018 um02097 PTS1 5': **cgcgta**CTGGCCCCGCCATCCAGCCACGCGAGGTCAAAGCTTTG**at**

MJ019 um02097 PTS1 3': **ctaga**TCAAAGCTTTGACCTCGCGTGGCTGGATGGCGGGGCCAG**ta**

GFP-PTS1_{um02208} - pJA254

MJ020 um02208 PTS1 5': **cgcgta**ACAGACTTTGATTCCGACCTGCCTCGTGCCAAGTTGTAA**t**

MJ021 um02208 PTS1 3': **ctaga**TTACAACTTGGCACGAGGCAGGTCGGAATCAAAGTCTGT**ta**

GFP-PTS1_{um03158} - pJA255

MJ022 um03158 PTS1 5': **cgcgta**GAGTCACTTCGCGCCGCTGCAGCTAAGAGCAAGTTGTAA**t**

MJ023 um03158 PTS1 3': **ctaga**TTACAACTTGCTCTTAGCTGCAGCGGCGGAAGTGACTC**ta**

GFP-PTS1_{um03299} - pJA82

MG145 TPI um 5' U: **cgcgta**GCTAACGCTTcActagctggccagtcggctaggatctg**at**

MG146 TPI um 3' U: **ctaga**tcagatcctagccgactggccagctagTgAAGCGTTAGC**ta**

GFP-PTS1_{um04744} - pJA148

MH206 um04744 PTS1 5': **cgcgta**CAGGCTTGCATTTTGAGGCCACACGCCCAATTTGTGAt

MH207 um04744 PTS1 3': **ctaga**TCACAAATTGTGGGCGTGTGGCCTCAAATGCAAGCCTGta

GFP-PTS1_{um05230} - pJA154

MH194 um05230 PTS1 5': **cgcgta**AACGACCAGATGAACCAGTGGATCCAACAGAATCTCTAGt

MH195 um05230 PTS1 3': **ctaga**CTAGAGATTCTGTTGGATCCACTGGTTCATCTGGTCGTTta

GFP-PTS1_{um06153} - pJA151

MH212 um06153 PTS1 5': **cgcgta**ACGCTCCCGCAGCTATCTTCGCCGCGAGCAAATCTGTAGt

MH213 um06153 PTS1 3': **ctaga**CTACAGATTTGCTCGCGGCGAAGATAGCTGCGGGAGCGTta

GFP-PTS1_{um06400} - pJA256

MJ024 um06400 PTS1 5': **cgcgta**GCCTTGCTTGCCAAGGCTGGTATCAAGTCTCACCTGTGAt

MJ025 um06400 PTS1 3': **ctaga**TCACAGGTGAGACTTGATACCAGCCTTGGCAAGCAAGGct

GFP-PTS1_{um06507} - pJA172

MH464 um06507 PTS1 5': **cgcgta**CCGATTTCACTACCAGTTGGCCTCCCGAGCAAGCTGTGAt

MH465 um06507 PTS1 3': **ctaga**TCACAGCTTGCTCGGGAGGCCAACTGGTACTGAAATCGGta

GFP-PTS1_{um10273} - pJA257

MJ026 um10273 PTS1 5': **cgcgta**GTTATGCAGAAACAGACGCCCAAATTTGCCAAGCTGTGAt

MJ027 um10273 PTS1 3': **ctaga**TCACAGCTTGGCAAATTTGGGCGTCTGTTTCTGCATAAct

GFP-PTS1_{um10538} - pJA158

MH204 um10538 PTS1 5': **cgcgta**AAGCGCGAGGATCAGAACGAGGCCAAAGCAAATTTGTGAt

MH205 um10538 PTS1 3': **ctaga**TCACAAATTTGCTTTGGCCTCGTTCTGATCCTCGCGCTTta

GFP-PTS1_{um10665} - pJA258

MJ028 um10665 PTS1 5': **cgcgta**CAGCAGCTCAAGCTCGTTGGTCCTCAGAGCAAGTTCTGAt

MJ029 um10665 PTS1 3': **ctaga**TCAGAACTTGCTCTGAGGACCAACGAGCTTGAGCTGCTGta

GFP-PTS1_{um10797} - pJA159

MH190 um10797 PTS1 5': **cgcgta**AGTCAGATCAAGCAACACTCGGAACGCCGAATTTGTAGt

MH191 um10797 PTS1 3': **ctaga**CTACAAATTCGGGCGTTCCGAGTGTTGCTTGATCTGACTta

GFP-PTS1_{um10825} - pJA259

MJ030 um10825 PTS1 5': **cgcgta**ATTCGCTTGGATGGCGCTTCAAGACTCGGCAAGCTTTAGt

MJ031 um10825 PTS1 3': **ctaga**CTAAAGCTTGCCGAGTCTTGAAGCGCCATCCAAGCGAATta

GFP-PTS1_{um11001} - pJA128

MG942 um11001 PTS1 5': **cgcgta**GAGGCGGATAGAGCAAGATCGAGAGCTAGCAATCTGTAAAt

MG943 um11001 PTS1 3': **ctaga**TTACAGATTGCTAGCTCTCGATCTTGCTCTATCCGCCTCta

GFP-PTS1_{um11938} - pJA260

MJ032 um11938 PTS1 5': **cgcgta**CTCGACGGTGTGCTCAAGTCCCAGAAGGCCAAGCTCTAA**t**

MJ033 um11938 PTS1 3': **ctaga**TTAGAGCTTGGCCTTCTGGGACTTGAGCACACCGTCGAG**ta**

GFP-PTS1_{um11953} - pJA133

MG917 um11593 PTS1 5': **cgcgta**AAGGTCAGGCGTGCTCACAAAATGGATCCTCACTTGTAG**t**

MG918 um11593 PTS1 3': **ctaga**CTACAAGTGAGGATCCATTTTGTGAGCACGCCTGACCTT**ta**

GFP-PTS1_{GapdB.c.} - pJA76

MG161 gapd bf 5' U: **cgcgta**GTCGAGCTCAAGCCCAACGCTCACCCGCAGAAGCTCTAA**t**

MG162 gapd bf 3' U: **ctaga**TTAGAGCTTCTGCGGGTGAGCGTTGGGCTTGAGCTCGAC**ta**

RFP-PTS1-Fusionen für die Expression in *S. cerevisiae* Das Plasmid pCT320 [280] wurde so verändert, dass sich das zu testende PTS1 direkt über *Hind*III und *Pst*I hinter den RFP-Tag einbringen ließ [130]. Die zu testenden PTS1 wurden als Oligonukleotide bestellt, annealt und in das modifizierte pCT320 (pJA1) ligiert.

RFP-PTS1_{Pgk2H.s.} - pJA273

MG163 pgk hs 5' H: **agctt**AAAGTCCTTCCTGGGGTGGATGCTCTCAGCAATATTTAG**ctgca**

MG164 pgk hs 3' H: **g**CTAAATATTGCTGAGAGCATCCACCCCAGGAAGGACTTT**a**

RFP-PTS1_{um05230} - pJA274

MJ329 PTS1 shy1 5' H: **agctt**AACGACCAGATGAACAGTGGATCCAACAGAATCTCTAG**ctgca**

MJ330 PTS1 shy1 3' H: **g**CTAGAGATTCTGTTGGATCCACTGGTTCATCTGGTCGTT**a**

Insertionen und Deletionen in *S. cerevisiae* Um ins Genom von *S. cerevisiae* GFP zu inserieren oder Gene zu deletieren, kamen folgende Primer zum Einsatz:

GFP-Sps19p

PCR mit MF488 und MF489 auf pYM-N9, Transformation, Selektion -Leu

MF488 5'sps19 tag: A**CACTTTT**AGAGTTTGGGAGGTCGTATGTT**CGAGTCATGGATACTCGTACGCTGC-AGGTCGAC**

MF489 3'sps19 tag: AGAACCCTCAGTAACGAATTTGCCGTCCAAAGTGT**TTGCTGTATTCATCGATGA-ATTCTCTGTCG**

Δ pex5

PCR mit MI303 und MI304 auf pKS133, Transformation, Selektion auf Hyg

MI303 kopex5p s1 fwd: CTATTTTGGATATATATACATCAATAAACAATATATCATAACACATG**cgtacgctg-caggtcgac**

MI304 kopex5 rev s2: GAATTTGGGCAGTGATGCGAGAACATAAAATTGCGGAGAACCATATCA**atcgatga-attcgagctcg**

5.6 Mikroskopie

Mikroskopie von *U. maydis* und *S. cerevisiae* wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 200M mit einem Ludel Piezo Drive (Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Verwendet wurden die Fluorophore eGFP (Excitation: 488 nm, Emission: 509 nm), mCherry und RFP (Excitation: 587 nm, Emission: 610 nm). Die zu untersuchenden Zellen wurden zu 5 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht bedeckten Objektträger getropft und ein Deckgläschen aufgelegt. Der Wasseragar dient der Fixierung der Zellen an ihrer Position zur Vermeidung unscharfer Bilder. Zur Anregung der Fluorophore wurden die zur Wellenlänge passenden Filter genutzt. Vergleichsfotos wurden im Hellfeld (DL) aufgenommen. Die Dokumentation erfolgte mit einer Kamera des Typs ORCA und der Software Velocity 5.0. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit ImageJ [282].

5.7 Biochemische Methoden

5.7.1 Isolierung denaturierter Proteine aus *U. maydis*

Eine *U. maydis*-Kultur wurde (optional) dreifach mit 100 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 µl Thorner Puffer mit 50 mM DTT pro 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,0 resuspendiert und für 5 - 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Reaktionsgefäße für 5 - 10 min schüttelnd inkubiert (Vibrax) und danach erneut für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bei Bedarf bei -80 °C gelagert und vor dem Laden auf ein SDS-Gel erneut für 5 min bei 95 °C aufgekocht und abzentrifugiert.

Thorner-Puffer

8 M Urea
5 % (w/v) SDS
0,1 mM Na₂-EDTA
0,01 % (w/v) Bromphenolblau
50 mM DTT (Dithiothreitol) - frisch zugeben
in 100 mM Tris-HCl pH 6,8

5.7.2 Protein-Elektrophorese

Proteine wurden nach Laemmli, 1970 mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt [283]. Die Gele setzten sich aus Sammel- und Trenngel zusammen, wobei das obere Sammelgel der Konzentration der Proteine dient und im unteren Trenngel die Proteine nach Größe aufgetrennt werden. Als Größenstandard diente ein Proteinstandardgemisch (15 - 170 kDa, Prestained Page Ruler, Fermentas). Die Auftrennung erfolgte zuerst bei 120 V (Sammelgel) und anschließend bei 150 V (Trenngel) in einer Gelkammer (Mini Protean System, Bio-Rad) gefüllt mit SDS-Laufpuffer.

Sammelgel

200 mM Glycerin
0,2 % (w/v) SDS
in 25 mM Tris-HCl pH 8,8

Trenngel

8 - 12 % (v/v) Acrylamid
0,1 % (w/v) SDS
in 375 mM Tris-HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05 % (v/v) TEMED

SDS-Laufpuffer

200 mM Glycerin
0,2 % (w/v) SDS
in 25 mM Tris-HCl pH 8,8

5.7.3 Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer-System (Bio-Rad) nach Herstellerempfehlung. Nach dem Blotten wurde die Membran für 15 min in 10 % Milchpulver in TBS-T inkubiert. Zur Überprüfung der Expression der Stämme mit HA-Pex5-Varianten wurde die Membran mit dem Antikörper α -HA (Sigma-Aldrich) in 4 % Milch (in TBS-T) über Nacht schwenkend bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 - 10 min in TBS-T wurde die Membran für 30 - 60 min mit dem sekundären Antikörper (HRP-conjugated goat anti-mouse, Santa Cruz; in 4 % Milchpulver in TBS-T) bei RT schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 5 - 10 min mit TBS-T gewaschen.

Zur Entwicklung wurde die Membran mit einer Mischung aus Detektionslösung A und B für 1 min inkubiert und die Signale mit einem Chemocam Imaging System (Intas, Göttingen) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ [\[282\]](#).

Western-Transfer-Puffer

200 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
in 25 mM Tris-HCl pH 10,4

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Detektionslösung A

100 mM Tris/HCl pH 8,5
2,5 mM Luminol
400 μ M p-Cumarsäure

Detektionslösung B

100 mM Tris/HCl pH 8,5
5,4 mM H₂O₂

5.8 Bioinformatik

Folgende Datenbanken wurden für Suche und Vergleich von Sequenzen verwendet: National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org), UniProt (www.uniprot.org), Pedant *Ustilago maydis* Data Base (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_t237631_Ust_maydi_v2GB), *Saccharomyces* Genome Database (SGD, www.yeastgenome.org). Zur Suche von Aminosäuremotiven im Genom von *U. maydis* wurde der Pattern Search von Pedant (http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_t237631_Ust_maydi_v2GB) genutzt. Um WD-40 Repeats in Pex7 zu finden, kam das Tool WD40-repeat protein Structure Predictor (WDSP, <http://wu.scbb.pkusz.edu.cn/wdsp/>) zum Einsatz. Die Wahrscheinlichkeit eines PTS1-Motivs in C-Termini wurde mit dem PTS1-Predictor mit der „general function“ bestimmt (<http://mendel.imp.ac.at/pts1/>). Nach der TPR-Konsensussequenz in den Pex5-Proteinen wurde mit dem TPR-Predictor gesucht (TPRpred, <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred>). Das Alignment verschiedener Pex5-Proteine wurde mit MUSCLE, EMBL-EBI durchgeführt (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/). Kristallstrukturen von Proteinen sind in der Protein Datenbank (RCSB PDB, www.rcsb.org/pdb/home/home.do) zu finden und die Strukturen wurden mittels PyMOL visualisiert (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC., www.pymol.org). Der phylogenetische Baum wurde wie in Yifrach *et al.* [129] mit der Software MEGA7 (www.megasoftware.net) [284] mit der *Maximum Likelihood method* [285] erstellt. *C. neoformans* Pex5 sind („Pex5“ - XP_012047196.1) und („Pex5_2“ - XP_012052851.1).

Literatur

- [1] Agatha Schlüter, Stéphane Fourcade, Raymond Ripp, Jean Louis Mandel, Olivier Poch, and Aurora Pujol. The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Molecular biology and evolution*, 23(4):838–845, 2006.
- [2] Wolf Kunau. Peroxisomes: Morphology, function, biogenesis and disorders-Introduction, 2006.
- [3] Markus Islinger, Sandra Grille, H Dariush Fahimi, and Michael Schrader. The peroxisome: an update on mysteries. *Histochemistry and cell biology*, 137(5):547–574, 2012.
- [4] Ronald J A Wanders and Hans R Waterham. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.*, 75:295–332, 2006.
- [5] M Islinger, M J R Cardoso, and M Schrader. Be different - the diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(8):881–897, 2010.
- [6] Jennifer J Smith and John D Aitchison. Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12):803–817, 2013.
- [7] Pedro Brites, Hans R Waterham, and Ronald J A Wanders. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1636(2):219–231, 2004.
- [8] Makoto Hayashi and Mikio Nishimura. Entering a new era of research on plant peroxisomes. *Current opinion in plant biology*, 6(6):577–582, 2003.
- [9] Sigrun Reumann and Andreas P M Weber. Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C₂ cycle have become filled - others remain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1496–1510, 2006.
- [10] Markus Kunze, Itsara Pracharoenwattana, Steven M Smith, and Andreas Hartig. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1441–1452, 2006.
- [11] Richard Zimmermann and Walter Neupert. Biogenesis of glyoxysomes. *European Journal of Biochemistry*, 112(2):225–233, 1980.
- [12] Ida J van der Klei, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, and Marten Veenhuis. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1453–1462, 2006.
- [13] Marco A van den Berg, Richard Albang, Kaj Albermann, Jonathan H Badger, Jean-Marc Daran, Arnold J M Driessen, Carlos Garcia-Estrada, Natalie D Fedorova, Diana M Harris, and Wilbert H M Heijne. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature biotechnology*, 26(10):1161–1168, 2008.
- [14] Gregory Jedd and Nam-Hai Chua. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology*, 2(4):226–231, 2000.
- [15] Thomas Lanyon-Hogg, Stuart L Warriner, and Alison Baker. Getting a camel through the eye of a needle: the import of folded proteins by peroxisomes. *Biology of the Cell*, 102(4):245–263, 2010.

- [16] Evelyn Dixit, Steeve Boulant, Yijing Zhang, Amy S Y Lee, Charlotte Odendall, Bennett Shum, Nir Hacohen, Zhijian J Chen, Sean P Whelan, and Marc Fransen. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*, 141(4):668–681, 2010.
- [17] Federica Facciotti, Gundimeda S Ramanjaneyulu, Marco Lepore, Sebastiano Sansano, Marco Cavallari, Magdalena Kistowska, Sonja Forss-Petter, Guanghui Ni, Alessia Colone, and Amit Singhal. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nature immunology*, 13(5):474–480, 2012.
- [18] Jiangwei Zhang, Jinhee Kim, Angela Alexander, Shengli Cai, Durga Nand Tripathi, Ruhee Dere, Andrew R Tee, Jacqueline Tait-Mulder, Alessia Di Nardo, and Juliette M Han. A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nature cell biology*, 15(10):1186–1196, 2013.
- [19] Marcus Nordgren and Marc Fransen. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie*, 98:56–62, 2014.
- [20] Yves Poirier, Vasily D Antonenkov, Tuomo Glumoff, and J Kalervo Hiltunen. Peroxisomal β -oxidation - a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1413–1426, 2006.
- [21] Oksana Ivashchenko, Paul P Van Veldhoven, Chantal Brees, Ye-Shih Ho, Stanley R Terlecky, and Marc Fransen. Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk. *Molecular biology of the cell*, 22(9):1440–1451, 2011.
- [22] Bo Wang, Paul P Van Veldhoven, Chantal Brees, Noemí Rubio, Marcus Nordgren, Oksana Apanasets, Markus Kunze, Myriam Baes, Patrizia Agostinis, and Marc Fransen. Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65:882–894, 2013.
- [23] Margaret Neuspiel, Astrid C Schauss, Emelie Braschi, Rodolfo Zunino, Peter Rippstein, Richard A Rachubinski, Miguel A Andrade-Navarro, and Heidi M McBride. Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Current Biology*, 18(2):102–108, 2008.
- [24] Hannah K Delille and Michael Schrader. Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45):31107–31115, 2008.
- [25] M Schrader, N A Bonekamp, and M Islinger. Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(9):1343–1357, 2012.
- [26] Toni Gabaldón. Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541):765–773, 2010.
- [27] Andrei Fagarasanu, Fred D Mast, Barbara Knoblach, and Richard A Rachubinski. Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9):644–654, 2010.
- [28] Sarah T South and Stephen J Gould. Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *The Journal of cell biology*, 144(2):255–266, 1999.
- [29] Henk F Tabak, Adabella van der Zand, and Ineke Braakman. Peroxisomes: minted by the ER. *Current opinion in cell biology*, 20(4):393–400, 2008.

- [30] Ben Distel, Ralf Erdmann, Stephen J Gould, Günter Blobel, Denis I Crane, James M Cregg, Gabriele Dodt, Yukio Fujiki, Joel M Goodman, and Wilhelm W Just. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *The Journal of Cell Biology*, 135(1):1–3, 1996.
- [31] Harald W Platta and Ralf Erdmann. Peroxisomal dynamics. *Trends in cell biology*, 17(10):474–484, 2007.
- [32] Changle Ma, Gaurav Agrawal, and Suresh Subramani. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *The Journal of cell biology*, 193(1):7–16, 2011.
- [33] Peter K Kim, Robert T Mullen, Uwe Schumann, and Jennifer Lippincott-Schwartz. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *The Journal of cell biology*, 173(4):521–532, 2006.
- [34] Alexander Aranovich, Rong Hua, Andrew D Rutenberg, and Peter K Kim. PEX16 contributes to peroxisome maintenance by constantly trafficking PEX3 via the ER. *J Cell Sci*, 127(17):3675–3686, 2014.
- [35] Rong Hua, Satinder K Gidda, Alexander Aranovich, Robert T Mullen, and Peter K Kim. Multiple domains in PEX16 mediate its trafficking and recruitment of peroxisomal proteins to the ER. *Traffic*, 16(8):832–852, 2015.
- [36] Rong Hua and Peter K Kim. Multiple paths to peroxisomes: Mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(5):881–891, 2016.
- [37] Katherine A Sacksteder, Jacob M Jones, Sarah T South, Xiaoling Li, Yifei Liu, and Stephen J Gould. PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *The Journal of cell biology*, 148(5):931–944, 2000.
- [38] B Agne. Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol. Cell*, 11:635–646, 2003.
- [39] Naganand Rayapuram and Suresh Subramani. The importomer - a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1613–1619, 2006.
- [40] Sofie J Huybrechts, Paul P Van Veldhoven, Chantal Brees, Guy P Mannaerts, Georgyi V Los, and Marc Fransen. Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. *Traffic*, 10(11):1722–1733, 2009.
- [41] Shirisha Nagotu, Ruchi Saraya, Marleen Otzen, Marten Veenhuis, and Ida J van der Klei. Peroxisome proliferation in *Hansenula polymorpha* requires Dnm1p which mediates fission but not de novo formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(5):760–769, 2008.
- [42] Barbara Knoblach, Xuejun Sun, Nicolas Coquelle, Andrei Fagarasanu, Richard L Poirier, and Richard A Rachubinski. An ER-peroxisome tether exerts peroxisome population control in yeast. *The EMBO journal*, 32(18):2439–2453, 2013.
- [43] Nobuyuki Shimozawa. Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal diseases. *Brain and Development*, 33(9):770–776, 2011.
- [44] Jao-Shwann Liang and Jyh-Feng Lu. Peroxisomal disorders with infantile seizures. *Brain and Development*, 33(9):777–782, 2011.

- [45] Marco Fidaleo. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Experimental and toxicologic pathology*, 62(6):615–625, 2010.
- [46] Hugo S A Heymans, Ruud B H Schutgens, Raymond Tan, Henk van den Bosch, and Piet Borst. Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). 1983.
- [47] A Poulos, H Singh, B Paton, P Sharp, and N Derwas. Accumulation and defective β -oxidation of very long chain fatty acids in Zellweger's syndrome, adrenoleukodystrophy and Refsum's disease variants. *Clinical genetics*, 29(5):397–408, 1986.
- [48] Hans R Waterham and Merel S Ebberink. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(9):1430–1441, 2012.
- [49] Ronald J A Wanders. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, 98:36–44, 2014.
- [50] Hans R Waterham, Sacha Ferdinandusse, and Ronald J A Wanders. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(5):922–933, 2016.
- [51] James A McNew and Joel M Goodman. An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *The Journal of cell biology*, 127(5):1245–1257, 1994.
- [52] John R Glover, David W Andrews, and Richard A Rachubinski. *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22):10541–10545, 1994.
- [53] Ana F Dias, Tânia Francisco, Tony A Rodrigues, Cláudia P Grou, and Jorge E Azevedo. The first minutes in the life of a peroxisomal matrix protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(5):814–820, 2016.
- [54] Paul B Lazarow and Yukio Fujiki. Biogenesis of peroxisomes. *Annual review of cell biology*, 1(1):489–530, 1985.
- [55] G Dodt and S J Gould. Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J. Cell Biol.*, 135:1763–1774, 1996.
- [56] Devi M. Nair, P. Edward Purdue, and Paul B. Lazarow. Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 167(4):599–604, 2004.
- [57] Sigrun Reumann. Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant physiology*, 135(2):783–800, 2004.
- [58] N Braverman, G Dodt, S J Gould, and D Valle. An isoform of pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Human molecular genetics*, 7(8):1195–1205, 1998.
- [59] Nathalie Galland, Fabian Demeure, Vronique Hannaert, Emilie Verplaetse, Didier Vertommen, Patrick Van Der Smissen, Pierre J. Courtoy, and Paul A M Michels. Characterization of the role of the receptors PEX5 and PEX7 in the import of proteins into glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(4):521–535, 2007.

- [60] Hidenori Otera, Kanji Okumoto, Keita Tateishi, Yuka Ikoma, Eiko Matsuda, Maki Nishimura, Toshiro Tsukamoto, Takashi Osumi, Kazumasa Ohashi, Osamu Higuchi, and Yukio Fujiki. Peroxisome Targeting Signal Type 1 (PTS1) Receptor Is Involved in Import of Both PTS1 and PTS2: Studies with PEX5-Defective CHO Cell Mutants. *Molecular and cellular biology*, 18(1):388–399, 1998.
- [61] A W Woodward and B Bartel. The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular biology of the cell*, 16(2):573–583, 2005.
- [62] Tsuyoshi Matsumura, Hidenori Otera, and Yukio Fiyiki. Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pl, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28):21715–21721, 2000.
- [63] Marta O Freitas, Tania Francisco, Tony A Rodrigues, Inês S Alencastre, Manuel P Pinto, Cláudia P Grou, Andreia F Carvalho, Marc Fransen, Clara Sá-Miranda, and Jorge E Azevedo. PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47):40509–40519, 2011.
- [64] Gregory J Gatto, Brian V Geisbrecht, Stephen J Gould, and Jeremy M Berg. A Proposed Model for the PEX5-Peroxisomal Targeting Signal-1 Recognition Complex. 246(September 1999):241–246, 2000.
- [65] Katja Gunkel, Ralf van Dijk, Marten Veenhuis, and Ida J van der Klei. Routing of Hansenula polymorpha alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery. *Molecular biology of the cell*, 15(3):1347–1355, 2004.
- [66] André T J Klein, Marlene van den Berg, Gina Bottger, Henk F Tabak, and Ben Distel. Saccharomyces cerevisiae acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28):25011–25019, 2002.
- [67] Yoshimi Oshima, Akane Kamigaki, Chihiro Nakamori, Shoji Mano, Makoto Hayashi, Mikio Nishimura, and Muneharu Esaka. Plant catalase is imported into peroxisomes by Pex5p but is distinct from typical PTS1 import. *Plant and cell physiology*, 49(4):671–677, 2008.
- [68] Gabriele Dodt, Daniel Warren, Elisabeth Becker, Peter Rehling, and Stephen J. Gould. Domain Mapping of Human PEX5 Reveals Functional and Structural Similarities to Saccharomyces cerevisiae Pex18p and Pex21p. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45):41769–41781, 2001.
- [69] Wolfgang Schliebs and Wolf H. Kunau. PTS2 Co-receptors: Diverse proteins with common features. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12):1605–1612, 2006.
- [70] Sébastien Léon, Lan Zhang, W. Hayes McDonald, John Yates, James M. Cregg, and Suresh Subramani. Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: Ubiquitin-dependent localization and regulation. *Journal of Cell Biology*, 172(1):67–78, 2006.
- [71] Marleen Otzen, Dongyuan Wang, Marcel G J Lunenborg, and Ida J van der Klei. Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *Journal of cell science*, 118(Pt 15):3409–3418, 2005.
- [72] P E Purdue, X Yang, and P B Lazarow. Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J. Cell Biol.*, 143:1859–1869, 1998.

- [73] Martin Sichting, Annette Schell-Steven, Holger Prokisch, Ralf Erdmann, and Hanspeter Rottensteiner. Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* Function Together in PTS2-dependent Protein Import into Peroxisomes. *Molecular biology of the cell*, 14(February):810–821, 2003.
- [74] Laura-Anne Brown and Alison Baker. Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (Review). *Molecular membrane biology*, 25(5):363–375, 2008.
- [75] Paul A Walton, Martin Wendland, Suresh Subramani, Richard A Rachubinski, and William J Welch. Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *The Journal of cell biology*, 125(5):1037–1046, 1994.
- [76] Suresh Subramani. Protein translocation into peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51):32483–32486, 1996.
- [77] Ewald H Hettema, Caroline C M Ruigrok, Marian Groot Koerkamp, Marlene Van Den Berg, Henk F Tabak, Ben Distel, and Ineke Braakman. The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import. *The Journal of cell biology*, 142(2):421–434, 1998.
- [78] Tania Francisco, Tony A Rodrigues, Manuel P Pinto, Andreia F Carvalho, Jorge E Azevedo, and Cláudia P Grou. Ubiquitin in the peroxisomal protein import pathway. *Biochimie*, 98:29–35, 2014.
- [79] Sohail Hasan, Harald W. Platta, and Ralf Erdmann. Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Frontiers in Physiology*, 4 SEP(September):1–12, 2013.
- [80] Jianping Hu, Alison Baker, Bonnie Bartel, Nicole Linka, Robert T Mullen, Sigrun Reumann, and Bethany K Zolman. Plant peroxisomes: biogenesis and function. *The Plant Cell*, 24(6):2279–2303, 2012.
- [81] Xueqian Liu, Changle Ma, and Suresh Subramani. Recent advances in peroxisomal matrix protein import. *Current opinion in cell biology*, 24(4):484–489, 2012.
- [82] Silke Oeljeklaus, Benedikt S Reinartz, Janina Wolf, Sebastian Wiese, Jason Tonillo, Katharina Podwojski, Katja Kuhlmann, Christian Stephan, Helmut E Meyer, and Wolfgang Schliebs. Identification of core components and transient interactors of the peroxisomal importomer by dual-track stable isotope labeling with amino acids in cell culture analysis. *Journal of proteome research*, 11(4):2567–2580, 2012.
- [83] C Reguenga, M E Oliveira, A M Gouveia, C Sá-Miranda, and J E Azevedo. Characterization of the mammalian peroxisomal import machinery: Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly. *J. Biol. Chem.*, 276:29935–29942, 2001.
- [84] Ines S Alencastre, Tony A Rodrigues, Cláudia P Grou, Marc Fransen, Clara Sá-Miranda, and Jorge E Azevedo. Mapping the cargo protein membrane translocation step into the PEX5 cycling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40):27243–27251, 2009.
- [85] Tania Francisco, Tony A Rodrigues, Marta O Freitas, Cláudia P Grou, Andreia F Carvalho, Clara Sá-Miranda, Manuel P Pinto, and Jorge E Azevedo. A cargo-centered perspective on the PEX5 receptor-mediated peroxisomal protein import pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40):29151–29159, 2013.
- [86] Alexandra M Gouveia, Carla P Guimarães, Márcia E Oliveira, Clara Sá-Miranda, and Jorge E Azevedo. Insertion of Pex5p into the peroxisomal membrane is cargo protein-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7):4389–4392, 2003.

- [87] Alexandra M Gouveia, Carla P Guimarães, Márcia E Oliveira, Carlos Reguenga, Clara Sá-Miranda, and Jorge E Azevedo. Characterization of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, using a cell-free in vitro import system. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1):226–232, 2003.
- [88] A M Gouveia, C Reguenga, M E Oliveira, C Sa-Miranda, and J E Azevedo. Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein. *J. Biol. Chem.*, 275:32444–32451, 2000.
- [89] Tony A Rodrigues, Cláudia P Grou, and Jorge E Azevedo. Revisiting the intraperoxisomal pathway of mammalian PEX7. *Scientific reports*, 5, 2015.
- [90] Michael Meinecke, Christian Cizmowski, Wolfgang Schliebs, Vivien Kruger, Sabrina Beck, Richard Wagner, and Ralf Erdmann. The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol*, 12(3):273–277, mar 2010.
- [91] Joseph E Faust, Avani Verma, Chengwei Peng, and James A McNew. An inventory of peroxisomal proteins and pathways in *Drosophila melanogaster*. *Traffic*, 13(10):1378–1392, 2012.
- [92] Alison M Motley, Ewald H Hettema, Rene Ketting, Ronald Plasterk, and Henk F Tabak. *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO reports*, 1(1):40–46, 2000.
- [93] Nicola H Gonzalez, Gregor Felsner, Frederic D Schramm, Andreas Klingl, Uwe-G Maier, and Kathrin Bolte. A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PloS one*, 6(9):e25316, 2011.
- [94] Makoto Hayashi, Mina Yagi, Kazumasa Nito, Tomoe Kamada, and Mikio Nishimura. Differential contribution of two peroxisomal protein receptors to the maintenance of peroxisomal functions in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15):14829–14835, 2005.
- [95] Naxhiely Martínez Ramón and Bonnie Bartel. Interdependence of the peroxisome-targeting receptors in *Arabidopsis thaliana*: PEX7 facilitates PEX5 accumulation and import of PTS1 cargo into peroxisomes. *Molecular biology of the cell*, 21(7):1263–1271, 2010.
- [96] Gabriele Dodt, Nancy Braverman, Candice Wong, Ann Moser, Hugo W Moser, Paul Watkins, David Valle, and Stephen J Gould. Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nature genetics*, 9(2):115–125, 1995.
- [97] Armando Jardim, Wei Liu, Ekaterina Zheleznova, and Buddy Ullman. Peroxisomal Targeting Signal-1 Receptor Protein PEX5 from *Leishmania donovani*, Molecular, Biochemical, and Immunocytochemical Characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18):13637–13644, 2000.
- [98] Friedrich Kragler, Günther Lametschwandtner, James Christmann, Andreas Hartig, and John J Harada. Identification and analysis of the plant peroxisomal targeting signal 1 receptor NtPEX5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22):13336–13341, 1998.
- [99] Dannel McCollum, Edward Monosov, and Suresh Subramani. The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells—the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *The Journal of Cell Biology*, 121(4):761–774, 1993.

- [100] Ida J van der Klei, Reinder E Hilbrands, Gert Jan Swaving, Hans R Waterham, Engel G Vrieling, Vladimir I Titorenko, James M Cregg, Wim Harder, and Marten Veenhuis. The Hansenula polymorpha PER3 gene is essential for the import of PTS1 proteins into the peroxisomal matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29):17229–17236, 1995.
- [101] Inge Van der Leij, Maartje M Franse, Ype Elgersma, Ben Distel, and Henk F Tabak. PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24):11782–11786, 1993.
- [102] S R Terlecky, W M Nuttley, D McCollum, E Sock, and S Subramani. The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *The EMBO journal*, 14(15):3627, 1995.
- [103] Stephen J Gould, Gilbert-Andre Keller, Nancy Hosken, Jack Wilkinson, and Suresh Subramani. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *The Journal of cell biology*, 108(5):1657–1664, 1989.
- [104] Cécile Brocard and Andreas Hartig. Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1565–1573, 2006.
- [105] Georg Neuberger, Sebastian Maurer-Stroh, Birgit Eisenhaber, Andreas Hartig, and Frank Eisenhaber. Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *Journal of molecular biology*, 328(3):567–579, 2003.
- [106] Georg Neuberger, Sebastian Maurer-Stroh, Birgit Eisenhaber, Andreas Hartig, and Frank Eisenhaber. Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *Journal of molecular biology*, 328(3):581–592, 2003.
- [107] Hidenori Otera, Kiyoko Setoguchi, Maho Hamasaki, Toshitaka Kumashiro, Nobuhiro Shimizu, and Yukio Fujiki. Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. *Molecular and cellular biology*, 22(6):1639–1655, 2002.
- [108] G J Gatto, B V Geisbrecht, S J Gould, and J M Berg. Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature Struct. Biol.*, 7:1091–1095, 2000.
- [109] Markus Albertini, Peter Rehling, Ralf Erdmann, Wolfgang Girzalsky, Jan A.K.W Kiel, Marten Veenhuis, and Wolf-H Kunau. Pex14p, a Peroxisomal Membrane Protein Binding Both Receptors of the Two PTS-Dependent Import Pathways. *Cell*, 89(1):83–92, 1997.
- [110] Gina Bottger, Phil Barnett, T J Klein, Astrid Kragt, Henk F Tabak, and Ben Distel. *Saccharomyces cerevisiae* PTS1 Receptor Pex5p Interacts with the SH3 Domain of the Peroxisomal Membrane Protein Pex13p in an Unconventional, Non-PXXP-related Manner. 11(November):3963–3976, 2000.
- [111] Christian Neufeld, Fabian V Filipp, Bernd Simon, Alexander Neuhaus, Nicole Schüller, Christine David, Hamed Kooshapur, Tobias Madl, Ralf Erdmann, and Wolfgang Schliebs. Structural basis for competitive interactions of Pex14 with the import receptors Pex5 and Pex19. *The EMBO Journal*, 28(6):745–754, 2009.

- [112] M E Oliveira, A M Gouveia, R A Pinto, C Sa-Miranda, and J E Azevedo. The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.*, 278:39483–39488, 2003.
- [113] J E Azevedo, J Costa-Rodrigues, C P Guimaraes, M E Oliveira, and C Sa-Miranda. Protein translocation across the peroxisomal membrane. *Cell Biochem. Biophys.*, 41:451–468, 2004.
- [114] Will A Stanley, Fabian V Filipp, Petri Kursula, Nicole Schüller, Ralf Erdmann, Wolfgang Schliebs, Michael Sattler, and Matthias Wilmanns. Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p. *Molecular cell*, 24(5):653–663, 2006.
- [115] Andreia F Carvalho, Manuel P Pinto, Cláudia P Grou, Inês S Alencastre, Marc Fransen, Clara Sá-Miranda, and Jorge E Azevedo. Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43):31267–31272, 2007.
- [116] Chris Williams, Marlene van den Berg, Richard R Sprenger, and Ben Distel. A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31):22534–22543, 2007.
- [117] Kanji Okumoto, Sachi Misono, Non Miyata, Yui Matsumoto, Satoru Mukai, and Yukio Fujiki. Cysteine ubiquitination of PTS1 receptor Pex5p regulates Pex5p recycling. *Traffic*, 12(8):1067–1083, 2011.
- [118] Non Miyata and Yukio Fujiki. Shuttling Mechanism of Peroxisome Targeting Signal Type 1 Receptor Pex5 : ATP-Independent Import and ATP-Dependent Export. 25(24):10822–10832, 2005.
- [119] Yukio Fujiki, Non Miyata, Naomi Matsumoto, and Shigehiko Tamura. Dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p involved in shuttling of the PTS1 receptor Pex5p in peroxisome biogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 36(1):109–113, 2008.
- [120] Harald W Platta, Fouzi El Magraoui, Daniel Schlee, Silke Grunau, Wolfgang Girzalsky, and Ralf Erdmann. Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *The Journal of cell biology*, 177(2):197–204, 2007.
- [121] Mykhaylo O Debelyy, Harald W Platta, Delia Saffian, Astrid Hensel, Sven Thoms, Helmut E Meyer, Bettina Warscheid, Wolfgang Girzalsky, and Ralf Erdmann. Ubp15p, a ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32):28223–28234, 2011.
- [122] Cláudia P Grou, Andreia F Carvalho, Manuel P Pinto, Sofie J Huybrechts, Clara Sá-Miranda, Marc Fransen, and Jorge E Azevedo. Properties of the ubiquitin-Pex5p thiol ester conjugate. *Journal of biological chemistry*, 284(16):10504–10513, 2009.
- [123] Cláudia P Grou, Tânia Francisco, Tony A Rodrigues, Marta O Freitas, Manuel P Pinto, Andreia F Carvalho, Pedro Domingues, Stephen A Wood, José E Rodríguez-Borges, and Clara Sá-Miranda. Identification of ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) as a deubiquitinase acting on ubiquitin-peroxin 5 (PEX5) thioester conjugate. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16):12815–12827, 2012.
- [124] Astrid Hensel, Sabrina Beck, Fouzi El Magraoui, Harald W Platta, Wolfgang Girzalsky, and Ralf Erdmann. Cysteine-dependent ubiquitination of Pex18p is linked to cargo translocation across the peroxisomal membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50):43495–43505, 2011.

- [125] Hidenori Otera, Tomoyuki Harano, Masanori Honsho, Kamran Ghaedi, Satoru Mukai, Atsushi Tanaka, Atsushi Kawai, Nobuhiro Shimizu, and Yukio Fujiki. The mammalian peroxin Pex5pl, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p??PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28):21703–21714, 2000.
- [126] Ritsu Ito, Masashi Morita, Norimasa Takahashi, Nobuyuki Shimozawa, Nobuteru Usuda, Tsuneo Imanaka, and Masaki Ito. Identification of Pex5pM, and retarded maturation of 3-ketoacyl-CoA thiolase and acyl-CoA oxidase in CHO cells expressing mutant Pex5p isoforms. *Journal of biochemistry*, 138(6):781–790, 2005.
- [127] Jung Ro Lee, Ho Hee Jang, Jin Ho Park, Ji Hyeon Jung, Seung Sik Lee, Soo Kwon Park, Yong Hun Chi, Jeong Chan Moon, Young Mee Lee, Sun Yong Kim, Jae Yean Kim, Dae Jin Yun, Moo Je Cho, Kyun Oh Lee, and Sang Yeol Lee. Cloning of two splice variants of the rice PTS1 receptor, OsPex5pL and OsPex5pS, and their functional characterization using pex5-deficient yeast and Arabidopsis. *Plant Journal*, 47(3):457–466, 2006.
- [128] Daniel Effelsberg, Luis Daniel Cruz-Zaragoza, Wolfgang Schliebs, and Ralf Erdmann. Pex9p is a new yeast peroxisomal import receptor for PTS1-containing proteins. *J Cell Sci*, 129(21):4057–4066, 2016.
- [129] Eden Yifrach, Silvia G Chuartzman, Noa Dahan, Shiran Maskit, Lior Zada, Uri Weill, Ido Yofe, Tsviya Olender, Maya Schuldiner, and Einat Zalcvar. Characterization of proteome dynamics during growth in oleate reveals a new peroxisome-targeting receptor. *J Cell Sci*, 129(21):4067–4075, 2016.
- [130] Johannes Freitag, Julia Ast, and Michael Bölker. Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature*, 485(7399):522–525, 2012.
- [131] L van der Voorn and H L Ploegh. The WD-40 repeat. *FEBS Lett*, 307(2):131–134, 1992.
- [132] Christian U Stirnimann, Evangelia Petsalaki, Robert B Russell, and Christoph W Müller. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in biochemical sciences*, 35(10):565–574, 2010.
- [133] Jing Wei Zhang and Paul B Lazarow. Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH2-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH2-terminal peptide. *The Journal of cell biology*, 132(3):325–334, 1996.
- [134] D Pan, T Nakatsu, and H Kato. Crystal structure of peroxisomal targeting signal-2 bound to its receptor complex Pex7p-Pex21p. *Nat Struct Mol Biol*, 20(8):987–993, 2013.
- [135] Yang Wang, Fan Jiang, Zhu Zhuo, Xian-Hui Wu, and Yun-Dong Wu. A method for WD40 repeat detection and secondary structure prediction. *PLoS One*, 8(6):e65705, 2013.
- [136] Satoru Mukai and Yukio Fujiki. Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49):37311–37320, 2006.
- [137] Vladimir I. Titorenko, Jennifer J. Smith, Rachel K. Szilard, and Richard A. Rachubinski. Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. *Journal of Cell Biology*, 142(2):403–420, 1998.
- [138] Jan A K W Kiel, Marten Veenhuis, and Ida J van der Klei. PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic*, 7(10):1291–1303, 2006.

- [139] Daniel Effelsberg, Luis Daniel Cruz-Zaragoza, Jason Tonillo, Wolfgang Schliebs, and Ralf Erdmann. Role of Pex21p for piggyback import of Gpd1p and Pnc1p into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42):25333–25342, 2015.
- [140] Antje Schäfer, Daniela Kerssen, Marten Veenhuis, Wolf-H Kunau, and Wolfgang Schliebs. Functional similarity between the peroxisomal PTS2 receptor binding protein Pex18p and the N-terminal half of the PTS1 receptor Pex5p. *Molecular and cellular biology*, 24(20):8895–906, 2004.
- [141] John R. Glover, David W. Andrews, Suresh Subramani, and Richard A. Rachubinski. Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 269(10):7558–7563, 1994.
- [142] Bart W Swinkels, S J Gould, A G Bodnar, R A Rachubinski, and S Subramani. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *The EMBO Journal*, 10(11):3255, 1991.
- [143] Oleh I. Petriv, Ling Tang, Vladimir I. Titorenko, and Richard A. Rachubinski. A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *Journal of Molecular Biology*, 341(1):119–134, 2004.
- [144] Markus Kunze, Georg Neuberger, Sebastian Maurer-Stroh, Jianmin Ma, Thomas Eck, Nancy Braverman, Johannes A. Schmid, Frank Eisenhaber, and Johannes Berger. Structural requirements for interaction of peroxisomal targeting signal 2 and its receptor PEX7. *Journal of Biological Chemistry*, 286(52):45048–45062, 2011.
- [145] Markus Kunze, Naila Malkani, Sebastian Maurer-Stroh, Christoph Wiesinger, Johannes A Schmid, and Johannes Berger. Mechanistic Insights into PTS2-mediated Peroxisomal Protein Import THE CO-RECEPTOR PEX5L DRASTICALLY INCREASES THE INTERACTION STRENGTH BETWEEN THE CARGO PROTEIN AND THE RECEPTOR PEX7. *Journal of Biological Chemistry*, 290(8):4928–4940, 2015.
- [146] J E Legakis and S R Terlecky. PTS2 protein import into mammalian peroxisomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(4):252–60, 2001.
- [147] C. Robb Flynn, Robert T. Mullen, and Richard N. Trelease. Mutational analyses of a type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes. *Plant Journal*, 16(6):709–720, 1998.
- [148] a Kato, M Hayashi, and M Nishimura. Oligomeric proteins containing N-terminal targeting signals are imported into peroxisomes in transgenic Arabidopsis. *Plant & cell physiology*, 40(6):586–91, 1999.
- [149] Wolfgang Girzalsky, Peter Rehling, Katharina Stein, Julia Kipper, Lars Blank, Wolf Hubert Kunau, and Ralf Erdmann. Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes. *Journal of Cell Biology*, 144(6):1151–1162, 1999.
- [150] Katharina Stein, Annette Schell-Steven, Ralf Erdmann, and Hanspeter Rottensteiner. Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import. *Molecular and cellular biology*, 22(17):6056–69, 2002.

- [151] Tony A Rodrigues, Inês S Alencastre, Tânia Francisco, Pedro Brites, Marc Fransen, Cláudia P Grou, and Jorge E Azevedo. A PEX7-centered perspective on the peroxisomal targeting signal type 2-mediated protein import pathway. *Molecular and cellular biology*, 34(15):2917–2928, 2014.
- [152] Malayko Montilla-Martinez, Sabrina Beck, Jessica Klümper, Michael Meinecke, Wolfgang Schliebs, Richard Wagner, and Ralf Erdmann. Distinct Pores for Peroxisomal Import of PTS1 and PTS2 Proteins. *Cell Reports*, pages 2126–2134, 2015.
- [153] Silke Grunau, Wolfgang Schliebs, Ruth Linnepe, Christian Neufeld, Christian Cizmowski, Benedikt Reinartz, Helmut E Meyer, Bettina Warscheid, Wolfgang Girzalsky, and Ralf Erdmann. Peroxisomal Targeting of PTS2 Pre-Import Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*, 10(4):451–460, 2009.
- [154] Michael Helm, Carsten Lück, Jakob Prestele, Georg Hierl, Pitter F Huesgen, Thomas Fröhlich, Georg J Arnold, Iwona Adamska, Angelika Görg, and Friedrich Lottspeich. Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27):11501–11506, 2007.
- [155] Igor V Kurochkin, Yumi Mizuno, Akihiko Konagaya, Yoshiyuki Sakaki, Christian Schönbach, and Yasushi Okazaki. Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in beta-oxidation of fatty acids. *The EMBO journal*, 26(3):835–845, 2007.
- [156] Holger Schuhmann, Pitter F Huesgen, Christine Gietl, and Iwona Adamska. The DEG15 serine protease cleaves peroxisomal targeting signal 2-containing proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*, 148(4):1847–1856, 2008.
- [157] Michael S Lee, Robert T Mullen, and Richard N Trelease. Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *The Plant Cell*, 9(2):185–197, 1997.
- [158] Sven Thoms, Julia Hofhuis, Christian Thöing, Jutta Gärtner, and Hartmut H Niemann. The unusual extended C-terminal helix of the peroxisomal α/β -hydrolase Lpx1 is involved in dimer contacts but dispensable for dimerization. *Journal of structural biology*, 175(3):362–371, 2011.
- [159] Xudong Yang, P Edward Purdue, and Paul B Lazarow. Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *European journal of cell biology*, 80(2):126–138, 2001.
- [160] Markus Islinger, Ka Wan Li, Jürgen Seitz, Alfred Völkl, and Georg H Lüers. Hitchhiking of Cu/Zn superoxide dismutase to peroxisomes - evidence for a natural piggyback import mechanism in mammals. *Traffic*, 10(11):1711–1721, 2009.
- [161] Y Elgersma, C W Van Roermund, R J Wanders, and H F Tabak. Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *The EMBO Journal*, 14(14):3472, 1995.
- [162] Akane Kamigaki, Shoji Mano, Kaori Terauchi, Yukiko Nishi, Yuki Tachibe-Kinoshita, Kazumasa Nito, Maki Kondo, Makoto Hayashi, Mikio Nishimura, and Muneharu Esaka. Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor. *The Plant Journal*, 33(1):161–175, 2003.
- [163] Fátima Camões, Markus Islinger, Sofia C Guimarães, Sreedhar Kilaru, Martin Schuster, Luis F Godinho, Gero Steinberg, and Michael Schrader. New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA

- oxidases and-dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(1):111–125, 2015.
- [164] F Camoes, N A Bonekamp, H K Delille, and M Schrader. Organelle dynamics and dysfunction: a closer link between peroxisomes and mitochondria. *Journal of inherited metabolic disease*, 32(2):163–180, 2009.
- [165] Michael Schrader. Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(5):531–541, 2006.
- [166] Michael Schrader and Yisang Yoon. Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays*, 29(11):1105–1114, 2007.
- [167] Michael Schrader, Sandra Grille, H Dariush Fahimi, and Markus Islinger. Peroxisome interactions and cross-talk with other subcellular compartments in animal cells. In *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*, pages 1–22. Springer, 2013.
- [168] Vasily D Antonenkov and J Kalervo Hiltunen. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(9):1374–1386, 2012.
- [169] Vladimir I Titorenko, Jean-Marc Nicaud, Huijie Wang, Honey Chan, and Richard A Rachubinski. Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of cell biology*, 156(3):481–494, 2002.
- [170] Jana Klose and James W Kronstad. The multifunctional β -oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell*, 5(12):2047–2061, 2006.
- [171] Matthias Kretschmer, Jana Klose, and James W Kronstad. Defects in mitochondrial and peroxisomal β -oxidation influence virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell*, 11(8):1055–1066, 2012.
- [172] Gero Steinberg and Jose Perez-Martin. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology*, 18(2):61–67, 2008.
- [173] Martin Münsterkötter and Gero Steinberg. The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics*, 8(1):1, 2007.
- [174] Jörg Kämper, Regine Kahmann, Michael Bölker, Li-Jun Ma, Thomas Brefort, Barry J Saville, Flora Banuett, James W Kronstad, Scott E Gold, and Olaf Müller. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115):97–101, 2006.
- [175] Thomas Brefort, Gunther Doehlemann, Artemio Mendoza-Mendoza, Stefanie Reissmann, Armin Djamei, and Regine Kahmann. *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual review of phytopathology*, 47:423–445, 2009.
- [176] Michael Bölker. *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147(6):1395–1401, 2001.
- [177] Christoph W Basse and Gero Steinberg. *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 5(2):83–92, 2004.

- [178] Steven J Klosterman, Michael H Perlin, Maria Garcia-Pedrajas, Sarah F Covert, and Scott E Gold. Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Advances in genetics*, 57:1–47, 2007.
- [179] Mahta Mazaheri-Naeini, Seyed Kazem Sabbagh, Yves Martinez, Nathalie Séjalon-Delmas, and Christophe Roux. Assessment of *Ustilago maydis* as a fungal model for root infection studies. *Fungal biology*, 119(2):145–153, 2015.
- [180] Robin Holliday. Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA repair*, 3(6):671–682, 2004.
- [181] Eun Young Yu, Milorad Kojic, William K Holloman, and Neal F Lue. Brh2 and Rad51 promote telomere maintenance in *Ustilago maydis*, a new model system of DNA repair proteins at telomeres. *DNA repair*, 12(7):472–479, 2013.
- [182] Gulay Dagdas. Studies on peroxisome motility in the model fungal system *Ustilago maydis*, 2015.
- [183] Yao-Qing Shen and Gertraud Burger. Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Functional & integrative genomics*, 9(2):145–151, 2009.
- [184] Mathias C Walter, Thomas Rattei, Roland Arnold, Ulrich Güldener, Martin Münsterkötter, Karamfilka Nenova, Gabi Kastenmüller, Patrick Tischler, Andreas Wölling, and Andreas Volz. PEDANT covers all complete RefSeq genomes. *Nucleic acids research*, 37(suppl 1):D408–D411, 2009.
- [185] M Louise Riley, Thorsten Schmidt, Irena I Artamonova, Christian Wagner, Andreas Volz, Klaus Heumann, Hans-Werner Mewes, and Dmitrij Frishman. PEDANT genome database: 10 years online. *Nucleic acids research*, 35(suppl 1):D354–D357, 2007.
- [186] M Louise Riley, Thorsten Schmidt, Christian Wagner, Hans-Werner Mewes, and Dmitrij Frishman. The PEDANT genome database in 2005. *Nucleic acids research*, 33(suppl 1):D308–D310, 2005.
- [187] Dmitrij Frishman, Martin Mokrejs, Denis Kosykh, Gabi Kastenmüller, Grigory Kolesov, Igor Zubrzycki, Christian Gruber, Birgitta Geier, Andreas Kaps, and Kaj Albermann. The PEDANT genome database. *Nucleic acids research*, 31(1):207–211, 2003.
- [188] Dmitrij Frishman, Kaj Albermann, Jean Hani, Klaus Heumann, Agnes Metanowski, Alfred Zollner, and Hans-Werner Mewes. Functional and structural genomics using PEDANT. *Bioinformatics*, 17(1):44–57, 2001.
- [189] Dmitrij Frishman and Hans-Werner Mewes. PEDANTic genome analysis. *Trends in Genetics*, 13(10):415–416, 1997.
- [190] Stephen F Altschul, Warren Gish, Webb Miller, Eugene W Myers, and David J Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3):403–410, 1990.
- [191] Yang Wang, Xue-Jia Hu, Xu-Dong Zou, Xian-Hui Wu, Zhi-Qiang Ye, and Yun-Dong Wu. WDSPPdb: a database for WD40-repeat proteins. *Nucleic acids research*, 43(D1):D339–D344, 2015.
- [192] Xian-Hui Wu, Yang Wang, Zhu Zhuo, Fan Jiang, and Yun-Dong Wu. Identifying the hotspots on the top faces of WD40-repeat proteins from their primary sequences by β -bulges and DHSW tetrads. *PLoS One*, 7(8):e43005, 2012.

- [193] Vikram Alva, Seung-zin Nam, S Johannes, Andrei N Lupas, The Mpi, and Bioinformatics Toolkit. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure. 44(April):410–415, 2016.
- [194] Manjunatha R Karpenahalli, Andrei N Lupas, and Johannes Söding. from protein sequences. 8:1–8, 2007.
- [195] Luca D D’Andrea and Lynne Regan. TPR proteins: the versatile helix. *Trends in biochemical sciences*, 28(12):655–662, 2003.
- [196] Alexander Neuhaus, Hamed Kooshapur, Janina Wolf, N Helge Meyer, Tobias Madl, Jürgen Saidowsky, Eva Hambruch, Anissa Lazam, Martin Jung, and Michael Sattler. A novel Pex14 protein-interacting site of human Pex5 is critical for matrix protein import into peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1):437–448, 2014.
- [197] Daniel Lockshon, Lauren E Surface, Emily O Kerr, Matt Kaeberlein, and Brian K Kennedy. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics*, 175(1):77–91, 2007.
- [198] Dominic Hoepfner, Danny Schildknecht, Ineke Braakman, Peter Philippsen, and Henk F Tabak. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*, 122(1):85–95, 2005.
- [199] Andreia F Carvalho, Joao Costa-Rodrigues, Isabel Correia, Joao Costa Pessoa, Tiago Q Faria, Cristina L Martins, Marc Fransen, Clara Sa-Miranda, and Jorge E Azevedo. The N-terminal half of the peroxisomal cycling receptor Pex5p is a natively unfolded domain. *Journal of molecular biology*, 356(4):864–875, 2006.
- [200] Leonidas Emmanouilidis, Mohanraj Gopalswamy, Daniel M Passon, Matthias Wilmanns, and Michael Sattler. Structural biology of the import pathways of peroxisomal matrix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(5):804–813, 2016.
- [201] Aner Gurvitz, Hanspeter Rottensteiner, Seppo H Kilpeläinen, Andreas Hartig, J Kalervo Hiltunen, Maximilian Binder, Ian W Dawes, and Barbara Hamilton. The *Saccharomyces cerevisiae* Peroxisomal 2, 4-Dienoyl-CoA Reductase Is Encoded by the Oleate-inducible GeneSPS19. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35):22140–22147, 1997.
- [202] Leen Amery, SANO Hideki, Guy P MANNAERTS, Jamie SNIDER, Marc FRANSEN, and Paul P van VELDHoven. Identification of PEX5p-related novel peroxisome-targeting signal 1 (PTS1)-binding proteins in mammals. *Biochemical Journal*, 357(3):635–646, 2001.
- [203] Inge Van Der Leij, Marlene Van Den Berg, Rolf Boot, Maartje Franse, Ben Distel, and Henk F Tabak. Isolation of peroxisome assembly mutants from *Saccharomyces cerevisiae* with different morphologies using a novel positive selection procedure. *The Journal of Cell Biology*, 119(1):153–162, 1992.
- [204] Peter Rehling, Adriane Skaletz-Rorowski, Wolfgang Girzalsky, Tineke Voorn-Brouwer, Maartje M Franse, Ben Distel, Marten Veenhuis, Wolf-H Kunau, and Ralf Erdmann. Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5):3593–3602, 2000.
- [205] Lan Zhang, Sébastien Léon, and Suresh Subramani. Two Independent Pathways Traffic the Intraperoxisomal Peroxin PpPex8p into Peroxisomes: Mechanism and Evolutionary Implications. *Mol. Biol. Cell*, 2:690–690, 2006.

- [206] Changle Ma, Danielle Hagstrom, Soumi Guha Polley, and Suresh Subramani. Redox-regulated cargo binding and release by the peroxisomal targeting signal receptor, Pex5. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38):27220–27231, 2013.
- [207] Franziska Rabe, Ziba Ajami-Rashidi, Gunther Doehlemann, Regine Kahmann, and Armin Djamei. Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 89(1):179–188, 2013.
- [208] Will A Stanley, Niko V Pursiainen, Elspeth F Garman, André H Juffer, Matthias Wilmanns, and Petri Kursula. A previously unobserved conformation for the human Pex5p receptor suggests roles for intrinsic flexibility and rigid domain motions in ligand binding. *BMC structural biology*, 7(1):1, 2007.
- [209] Parthasarathy Sampathkumar, Claudia Roach, Paul A M Michels, and Wim G J Hol. Structural insights into the recognition of peroxisomal targeting signal 1 by *Trypanosoma brucei* peroxin 5. *Journal of molecular biology*, 381(4):867–880, 2008.
- [210] Krisztián Fodor, Janina Wolf, Ralf Erdmann, Wolfgang Schliebs, and Matthias Wilmanns. Molecular requirements for peroxisomal targeting of alanine-glyoxylate aminotransferase as an essential determinant in primary hyperoxaluria type 1. *PLoS Biol*, 10(4):e1001309, 2012.
- [211] Krisztián Fodor, Janina Wolf, Katharina Reglinski, Daniel M Passon, Ye Lou, Wolfgang Schliebs, Ralf Erdmann, and Matthias Wilmanns. Ligand-Induced Compaction of the PEX5 Receptor-Binding Cavity Impacts Protein Import Efficiency into Peroxisomes. *Traffic*, 16(1):85–98, 2015.
- [212] Robert C Edgar. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5):1792–1797, 2004.
- [213] Robert C Edgar. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, 5(1):1, 2004.
- [214] Weizhong Li, Andrew Cowley, Mahmut Uludag, Tamer Gur, Hamish McWilliam, Silvano Squizzato, Young Mi Park, Nicola Buso, and Rodrigo Lopez. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic acids research*, 43(W1):W580–W584, 2015.
- [215] Hamish McWilliam, Weizhong Li, Mahmut Uludag, Silvano Squizzato, Young Mi Park, Nicola Buso, Andrew Peter Cowley, and Rodrigo Lopez. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, 41(W1):W597–W600, 2013.
- [216] W. Schliebs, J. Saidowsky, B. Agianian, G. Dodt, F. W. Herberg, and W.-H. Kunau. Recombinant Human Peroxisomal Targeting Signal Receptor PEX5: Structural Basis for Interaction of PEX5 with PEX14. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9):5666–5673, 1999.
- [217] K Nito, M Hayashi, and M Nishimura. Direct interaction and determination of binding domains among peroxisomal import factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 43(4):355–366, 2002.
- [218] Jungwoo Choe, Juliette Moyersoen, Claudia Roach, Tyan L. Carter, Erkang Fan, Paul A M Michels, and Wim G J Hol. Analysis of the sequence motifs responsible for the interactions of peroxins 14 and 5, which are involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*, 42(37):10915–10922, 2003.

- [219] Daniela Kerssen, Eva Hambruch, Wibke Klaas, Harald W. Platta, Ben De Kruijff, Ralf Erdmann, Wolf H. Kunau, and Wolfgang Schliebs. Membrane association of the cycling peroxisome import receptor Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37):27003–27015, 2006.
- [220] Jian-Rong Su, Kazuki Takeda, Shigehiko Tamura, Yukio Fujiki, and Kunio Miki. Crystal structure of the conserved N-terminal domain of the peroxisomal matrix protein import receptor, Pex14p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2):417–421, 2009.
- [221] Marc Fransen, Ilse Vastiau, Chantal Brees, Vanessa Brys, Guy P Mannaerts, and Paul P Van Veldhoven. Potential role for Pex19p in assembly of PTS-receptor docking complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13):12615–12624, 2004.
- [222] Will A. Stanley, Krisztian Fodor, Marc A. Marti-Renom, Wolfgang Schliebs, and Matthias Wilmanns. Protein translocation into peroxisomes by ring-shaped import receptors. *FEBS Letters*, 581(25):4795–4802, 2007.
- [223] Takashi Osumi, Toshiro Tsukamoto, and Shingo Hata. Signal peptide for peroxisomal targeting: replacement of an essential histidine residue by certain amino acids converts the amino-terminal presequence of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase to a mitochondrial signal peptide. *Biochemical and biophysical research communications*, 186(2):811–818, 1992.
- [224] Julia Ast, Alina Claudia Stiebler, Johannes Freitag, and Michael Bölker. Dual targeting of peroxisomal proteins. *Integrative Physiology*, 4(October):297, 2013.
- [225] D Roise and G Schatz. Mitochondrial presequences. *J Biol Chem*, 263(10):4509–4511, 1988.
- [226] Christine Gietl, Klaas Nico Faber, Ida J van der Klei, and Marten Veenhuis. Mutational analysis of the N-terminal topogenic signal of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase using the heterologous host *Hansenula polymorpha*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8):3151–3155, 1994.
- [227] Akira Kato, Makoto Hayashi, Maki Kondo, and Mikio Nishimura. Targeting and processing of a chimeric protein with the N-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *The Plant Cell*, 8(9):1601–1611, 1996.
- [228] S Reumann, G Chowdhary, and T Lingner. Characterization, prediction and evolution of plant peroxisomal targeting signals type 1 (PTS1s). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(5):790–803, 2016.
- [229] Jürgen Saidowsky, Gabriele Dodt, Kristina Kirchberg, Albrecht Wegner, Wolfgang Nastainczyk, Wolf-H Kunau, and Wolfgang Schliebs. The di-aromatic pentapeptide repeats of the human peroxisome import receptor PEX5 are separate high affinity binding sites for the peroxisomal membrane protein PEX14. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37):34524–34529, 2001.
- [230] Annette Schell-Steven, Katharina Stein, Mara Amoros, Christiane Landgraf, Rudolf Volkmer-Engert, Hanspeter Rottensteiner, and Ralf Erdmann. Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import. *Molecular and cellular biology*, 25(8):3007–3018, 2005.
- [231] W A Stanley, A Sokolova, A Brown, D T Clarke, M Wilmanns, and D I Svergun. Synergistic use of synchrotron radiation techniques for biological samples in solution: a case study on protein-ligand recognition by the peroxisomal import receptor Pex5p. *Journal of synchrotron radiation*, 11(6):490–496, 2004.

- [232] Chris Williams, Marlene van den Berg, and Ben Distel. *Saccharomyces cerevisiae* Pex14p contains two independent Pex5p binding sites, which are both essential for PTS1 protein import. *FEBS letters*, 579(16):3416–3420, 2005.
- [233] Marcus Nordgren, Tânia Francisco, Celien Lismont, Lore Hennebel, Chantal Brees, Bo Wang, Paul P Van Veldhoven, Jorge E Azevedo, and Marc Fransen. Export-deficient monoubiquitinated PEX5 triggers peroxisome removal in SV40 large T antigen-transformed mouse embryonic fibroblasts. *Autophagy*, 11(8):1326–1340, 2015.
- [234] Katarzyna B Moscicka, Sandra H Klompmaker, Dongyuan Wang, Ida J van der Klei, and Egbert J Boekema. The *Hansenula polymorpha* peroxisomal targeting signal 1 receptor, Pex5p, functions as a tetramer. *FEBS letters*, 581(9):1758–1762, 2007.
- [235] Wolfgang Schliebs, Wolfgang Girzalsky, and Ralf Erdmann. Peroxisomal protein import and ERAD: variations on a common theme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12):885–890, 2010.
- [236] Partha P Hazra, Ivet Suriapranata, William B Snyder, and Suresh Subramani. Peroxisome remnants in *pex3Δ* cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes. *Traffic*, 3(8):560–574, 2002.
- [237] M Veenhuis, M Mateblowski, W H Kunau, and W Harder. Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 3(2):77–84, 1987.
- [238] Georg Neuberger, Markus Kunze, Frank Eisenhaber, Johannes Berger, Andreas Hartig, and Cecile Brocard. Hidden localization motifs: naturally occurring peroxisomal targeting signals in non-peroxisomal proteins. *Genome biology*, 5(12):1, 2004.
- [239] Ido Yofe, Uri Weill, Matthias Meurer, Silvia Chuartzman, Einat Zalckvar, Omer Goldman, Shifra Bendor, Conny Schütze, Nils Wiedemann, Michael Knop, Anton Khmelinskii, and Maya Schuldinger. One library to make them all: Streamlining yeast library creation by a SWAp-Tag (SWAT) strategy. In *YEAST*, volume 13(4), pages 371–378, 2015.
- [240] Leonardo Peraza-Reyes, Sylvie Arnaise, Denise Zickler, Evelyne Coppin, Robert Debuchy, and Véronique Berteaux-Lecellier. The importomer peroxins are differentially required for peroxisome assembly and meiotic development in *Podospora anserina*: insights into a new peroxisome import pathway. *Molecular microbiology*, 82(2):365–377, 2011.
- [241] Marta O Freitas, Tânia Francisco, Tony A Rodrigues, Celien Lismont, Pedro Domingues, Manuel P Pinto, Cláudia P Grou, Marc Fransen, and Jorge E Azevedo. The peroxisomal protein import machinery displays a preference for monomeric substrates. *Open biology*, 5(4):140236, 2015.
- [242] Merel S Ebberink, Petra A W Mooyer, Janet Koster, Conny J M Dekker, François J M Eyskens, Carlo Dionisi-Vici, Peter T Clayton, Peter G Barth, Ronald J A Wanders, and Hans R Waterham. Genotype-phenotype correlation in PEX5-deficient peroxisome biogenesis defective cell lines. *Human mutation*, 30(1):93–98, 2009.
- [243] Ernest L Maynard, Gregory J Gatto, and Jeremy M Berg. Pex5p binding affinities for canonical and noncanonical PTS1 peptides. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(4):856–861, 2004.

- [244] Olof Emanuelsson, Arne Elofsson, Gunnar Von Heijne, and Susana Cristobal. In silico prediction of the peroxisomal proteome in fungi, plants and animals. *Journal of molecular biology*, 330(2):443–456, 2003.
- [245] Changle Ma and Sigrun Reumann. Improved prediction of peroxisomal PTS1 proteins from genome sequences based on experimental subcellular targeting analyses as exemplified for protein kinases from *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 59(13):3767–3779, 2008.
- [246] Will A Stanley and Matthias Wilmanns. Dynamic architecture of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12):1592–1598, 2006.
- [247] Pia A J Huber, Graeme M Birdsey, Michael J Lumb, David T R Prowse, Tommy J Perkins, Daniel R Knight, and Christopher J Danpure. Peroxisomal import of human alanine: glyoxylate aminotransferase requires ancillary targeting information remote from its C terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29):27111–27120, 2005.
- [248] Mitsunori Ikeda, Hiroaki Kanouchi, and Yohsuke Minatogawa. Characterization of peroxisomal targeting signals on alanine: glyoxylate aminotransferase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(1):131–134, 2008.
- [249] Masatoshi Yamasaki, Noriyo Hashiguchi, Chiharu Fujiwara, Tsuneo Imanaka, Toshiro Tsukamoto, and Takashi Osumi. Formation of peroxisomes from peroxisomal ghosts in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant upon complementation by protein microinjection. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50):35293–35296, 1999.
- [250] M J Santos, T Imanaka, H Shio, G M Small, and P B Lazarow. Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome - aberrant organelle assembly. *Science*, 239(4847):1536–1538, 1988.
- [251] Manuel J Santos, Scott C Henderson, Ann B Moser, Hugo W Moser, and Paul B Lazarow. Peroxisomal ghosts are intracellular structures distinct from lysosomal compartments in Zellweger syndrome: a confocal laser scanning microscopy study. *Biology of the Cell*, 92(2):85–94, 2000.
- [252] Marten Veenhuis, Masayuki Komori, Florian Salomons, Reinder E Hilbrands, Hans Hut, Richard J S Baerends, Jan A K W Kiel, and Ida J van der Klei. Peroxisomal remnants in peroxisome-deficient mutants of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS letters*, 383(1-2):114–118, 1996.
- [253] Shun-ichi Yamashita, Kakeru Abe, Yuki Tatemichi, and Yukio Fujiki. The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy*, 10(9):1549–1564, 2014.
- [254] Johannes Freitag, Julia Ast, Uwe Linne, Thorsten Stehlik, Domenica Martorana, Michael B??lker, and Bj??rn Sandrock. Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Molecular Microbiology*, 93(1):24–36, 2014.
- [255] Alexandra W C Einerhand, Tineke M Voorn-Brouwer, Ralf Erdmann, Wolf-H Kunau, and Henk F Tabak. Regulation of transcription of the gene coding for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 200(1):113–122, 1991.
- [256] Igor V Karpichev and Gillian M Small. Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 18(11):6560–6570, 1998.

- [257] Jacobus Albertyn, Stefan Hohmann, Johan M Thevelein, and Bernard A Prior. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6):4135–4144, 1994.
- [258] Markus Kunze, Friedrich Kragler, Maximilian Binder, Andreas Hartig, and Aner Gurvitz. Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *European Journal of Biochemistry*, 269(3):915–922, 2002.
- [259] John M. Graham. *Isolation of Peroxisomes from Tissue and Cells by Differential and Density Gradient Centrifugation*. 2001.
- [260] Thomas Gronemeyer, Sebastian Wiese, Rob Ofman, Christian Bunse, Magdalena Pawlas, Heiko Hayen, Martin Eisenacher, Christian Stephan, Helmut E Meyer, and Hans R Waterham. The proteome of human liver peroxisomes: identification of five new peroxisomal constituents by a label-free quantitative proteomics survey. *PLoS one*, 8(2):e57395, 2013.
- [261] Cees M J Sagt, Peter J ten Haaf, Ingeborg M Minneboo, Miranda P Hartog, Robbert A Damveld, Jan Metske van der Laan, Michiel Akeroyd, Thibaut J Wenzel, Francisca A Luesken, and Marten Veenhuis. Peroxirecretion: a novel secretion pathway in the eukaryotic cell. *BMC biotechnology*, 9(1):1, 2009.
- [262] Xiaoxi Liu, Jingjing Liu, Joshua D Lester, Sonja S Pijut, and Gregory A Graf. ABCD2 identifies a subclass of peroxisomes in mouse adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications*, 456(1):129–134, 2015.
- [263] Olof Emanuelsson, Henrik Nielsen, Søren Brunak, and Gunnar Von Heijne. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology*, 300(4):1005–1016, 2000.
- [264] Jan A K W Kiel, Marco A Van den Berg, Fabrizia Fusetti, Bert Poolman, Roel A L Bovenberg, Marten Veenhuis, and Ida J Van der Klei. Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Functional & integrative genomics*, 9(2):167–184, 2009.
- [265] Lei Wang, Patrick Berndt, Xiaojuan Xia, Jörg Kahnt, and Regine Kahmann. A seven-WD40 protein related to human RACK1 regulates mating and virulence in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 81(6):1484–1498, 2011.
- [266] Kai Heimel, Mario Scherer, David Schuler, and Jörg Kämper. The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *The Plant Cell*, 22(8):2908–2922, 2010.
- [267] Domingo Martínez-Soto and José Ruiz-Herrera. Regulation of the expression of the whole genome of *Ustilago maydis* by a MAPK pathway. *Archives of microbiology*, 197(4):575–588, 2015.
- [268] F M Ausubel, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman, J A Smith, and K Struhl. *Current protocols in molecular biology*. (Greene/Wiley Interscience, New York, NY). 1987.
- [269] Joseph Sambrook, Edward F Fritsch, and Tom Maniatis. *Molecular cloning*, volume 2. Cold spring harbor laboratory press New York, 1989.

- [270] Kary Mullis, Fred Faloona, Stephen Scharf, Rl Saiki, G Horn, and H Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, volume 51, pages 263–273. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- [271] Randall K Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B Mullis, Glenn T Horn, Henry A Erlich, and Norman Arnheim. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, 1985.
- [272] R K Saiki, D H Gelfand, S Stoffel, S T Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, and H A Ehrlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA. *Science*, 239:487–491, 1988.
- [273] Frederick Sanger, Steven Nicklen, and Alan R Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12):5463–5467, 1977.
- [274] Edwin M Southern. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3):503–517, 1975.
- [275] George M Church and Walter Gilbert. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(7):1991–1995, 1984.
- [276] J Kämper. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics*, 271(1):103–110, 2004.
- [277] A Brachmann, J König, C Julius, and M Feldbrügge. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(2):216–226, 2004.
- [278] Robert K Mortimer and John R Johnston. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*, 113(1):35–43, 1986.
- [279] C Aichinger, K Hansson, H Eichhorn, F Lessing, G Mannhaupt, W Mewes, and R Kahmann. Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 270(4):303–314, 2003.
- [280] Christian Renicke, Daniel Schuster, Svetlana Usherenko, Lars-Oliver Essen, and Christof Taxis. A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chemistry & biology*, 20(4):619–626, 2013.
- [281] Carsten Janke, Maria M Magiera, Nicole Rathfelder, Christof Taxis, Simone Reber, Hiromi Maekawa, Alexandra Moreno-Borchart, Georg Doenges, Etienne Schwob, and Elmar Schiebel. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11):947–962, 2004.
- [282] Michael D Abramoff, Paulo J Magalhães, and Sunanda J Ram. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7):36–42, 2004.
- [283] U K Laemmli. Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis. *Nature*, 277:680–685, 1970.
- [284] Sudhir Kumar, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, page msw054, 2016.
- [285] David T Jones, William R Taylor, and Janet M Thornton. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 8(3):275–282, 1992.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Julia Ast, geboren am 23.12.1987 in Plauen, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel „Import peroxisomaler Matrixproteine über die *Ustilago maydis* Rezeptoren Pex5a, Pex5b und Pex7“ selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, 15.01.2017

Julia Ast

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Michael Bölker danken, diese spannende Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu können. Auch möchte ich mich für die Anregungen, Diskussionen, Unterstützung und sein Vertrauen bedanken. Priv. Doz. Christof Taxis danke ich für die Zustimmung, ein Zweitgutachten zu erstellen, und im Besonderen für das Interesse an meiner Arbeit. Danke für all die Antworten auf meine Hefe- und Mikroskop-Fragen und für die Diskussionen und Vorschläge rund um das Thema Self Assembly-GFP. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Maier und Prof. Dr. Ralf Jacob für die Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören, bedanken.

Für finanzielle Unterstützung danke ich der MARburg Research Academy (MARA) und dem Graduiertenkolleg GRK 1216 für Intra- und Interzellulärem Transport und Kommunikation (IITC). Auch an dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Maier und auch Lucette Claudet für die ins GRK investierte Zeit und Arbeit bedanken. Auch danke ich dem Hessischen MentorinnenNetzwerk für viele spannende Gespräche, Einblicke in die Industrie und hilfreiche Kurse. Mein besonderer Dank geht dabei an meine Mentorin Renate Wingefeld, die mir zusätzliche Einblicke in die Arbeitswelt ermöglicht hat und bei Sorgen im Arbeitsalltag mit Humor und Rat zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Bölker, Mösch und Taxis. Ich danke euch für das angenehme Arbeitsklima, die wissenschaftsbezogenen Diskussionen und für die vielen Momente, in denen wir gemeinsam gelacht haben. Mit euch würde ich jederzeit noch einmal auf eine Konferenz fahren! Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Alina C. Stiebler, die mich für die Arbeit mit Proteinen und Western Blot begeistern konnte, Christian Renicke, der für jedes Problem eine Lösung kennt, Domenica Martorana, mit der man wunderbar im Team ein Projekt bearbeiten kann, Johannes Freitag, der mir mit seiner fortwährenden konstruktiven Kritik immer weitergeholfen hat, und Thorsten Stehlik, der immer mit am Start war.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie. Danke fürs Zuhören, für Unterstützung, für Rat, für Geduld und Nachsicht in der Schreibphase und dafür, dass ich immer auf euch zählen kann! Besonders seien an dieser Stelle mein Freund Sebastian, der mir immer den Rücken frei gehalten hat, und Michaela und Hagen, die sich die Mühe gemacht haben, diese Arbeit vor dem Druck zu lesen, hervorgehoben.

Danke!

